



Synthèse chimioenzymatique d'analogues de l'acide glutamique potentiellement actifs dans le système nerveux central

Zeinab Assaf

► To cite this version:

Zeinab Assaf. Synthèse chimioenzymatique d'analogues de l'acide glutamique potentiellement actifs dans le système nerveux central. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2010. Français. NNT : 2010CLF22077 . tel-00646967

HAL Id: tel-00646967

<https://theses.hal.science/tel-00646967>

Submitted on 2 Dec 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : D.U. 2077

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
U.F.R. Sciences et technologies

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES
N° 660

THESE

Présenté en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité: Chimie Organique Biologique

Par

Zeinab ASSAF

Master Recherche

TITRE

**Synthèse chimioenzymatique d'analogues de l'acide glutamique
potentiellement actifs dans le système nerveux central**

Rapporteurs :

ACHER Francine, directeur de recherche, CNRS, Université Paris VII
MANN André, directeur de recherche, CNRS, Université Strasbourg I

Examineurs :

ROLLAND Valérie, professeur, Université Montpellier II
TAILLEFUMIER Claude, professeur, Université Clermont-Ferrand II
GEFFLAUT Thierry, professeur, Université Clermont-Ferrand II, directeur de thèse.

Remerciement

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Synthèse et Etudes de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB, UMR CNRS 6504) de l'Université Blaise Pascal dirigé par le Dr. Anne-Marie Delort, que je remercie pour son accueil.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse le Pr. Thierry Gefflaut pour la qualité de son encadrement. Ses conseils, sa disponibilité, sa patience, sa gentillesse, son encouragement et sa rigueur scientifique m'ont été d'une aide précieuse. Sa présence et ses conseils, lors de la rédaction de cette thèse, ont été particulièrement précieux, ses propositions et corrections ont aidé à améliorer significativement la qualité de ce mémoire. J'espère que cette thèse sera un remerciement suffisant au soutien et à la confiance dont il a fait preuve à mon égard.

Je remercie également les membres du jury, le Dr. Francine Acher, le Dr. André Mann, le Pr. Valérie Rolland et le Pr. Claude Taillefumier pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je remercie vivement le Dr. Franck Charmantray, le Dr. Christine Hélaine, le Dr. José Antonio Castillo, le Dr. Carlos Fernandes et le Dr Estelle Gallienne pour leur aide, leurs encouragements, leur soutien et la sympathie qu'ils m'ont témoigné.

Un grand Merci à toute l'équipe BioMeta. J'adresse mes sincères remerciements au Pr Laurence Hecquet, Pr Marielle Lemaire, Dr Virgil Hélaine, Martine Sancelme, Agnès Rambourdin et plus particulièrement Monsieur Henri Veschambre. Merci Henri pour ton aide, ta gentillesse, pour nos échanges qui m'ont été très utiles. Je remercie également Stéphanie Bonnefoy et Carole Turpin pour leur bonne humeur qui apporte beaucoup de joie au secrétariat.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Virgine Vinatier et Hicham Kenai pour leur contribution à ce travail mais aussi pour leur sympathie.

Un grand merci à tous mes collègues du labo pour leur amitié et leur bonne humeur : Greg, Johan, Flora, Mohamed, Ayman, Federico, Emmanuelle, Antony, Cécile, Aurélien, Michaël, Julianne, Nadia et Julie.

Merci à Bertrand pour la masse, à Régis pour la RMN et à Aurélie pour la HPLC.

Un grand Merci à tous mes amis pour leur aide et leur sympathie, et plus particulièrement au docteur Fadi Farah qui m'a beaucoup soutenue lors de la rédaction.

Je remercie tout particulièrement ma famille, mes parents, mes frères, mes sœurs, mes beaux frères, ma tante et mon oncle pour leur irremplaçable et inconditionnel soutien. Merci encore pour tout ce que vous avez fait pour moi. Cette thèse est à vous, aussi. Ma mère et mon père cette thèse est le fruit de tous vos sacrifices durant mes études, merci pour m'avoir permis d'être ce que je suis et m'avoir donné la liberté nécessaire à mon épanouissement. Que cette thèse témoigne de mon respect et de mon amour.

PARTIE 1: BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1 Le système Glutamatergique.....	23 -
1.1 Importance physiologique du Glu	23 -
1.2 Le système Glutamatergique du SNC	25 -
1.3 Les récepteurs spécifiques du glutamate	27 -
1.3.1 Les récepteurs ionotropiques: iGluRs	27 -
1.3.1.1 Les Récepteurs NMDA (NMDARs)	29 -
1.3.1.1.1 Structure des NMDARs	29 -
1.3.1.1.2 Fonctions des NMDARs	29 -
1.3.1.1.3 Pharmacologie des NMDARs et potentialités thérapeutiques	30 -
1.3.1.1.3.1 Antagonistes compétitifs des NMDARs	31 -
1.3.1.1.3.2 Antagonistes non compétitifs des NMDARs	32 -
1.3.1.1.3.2.1 Bloqueurs des canaux ioniques	32 -
1.3.1.1.3.2.2 Antagonistes se liant au site de la glycine'	33 -
1.3.1.1.3.2.3 Inhibiteurs allostériques des NMDARs	34 -
1.3.1.2 Les Récepteurs AMPA (AMPA)	34 -
1.3.1.2.1 Structure des AMPARs	34 -
1.3.1.2.2 Fonction des AMPARs	36 -
1.3.1.2.3 Ligands des AMPARs et potentialités thérapeutiques	36 -
1.3.1.2.3.1 Agonistes des AMPARs	37 -
1.3.1.2.3.2 Antagonistes compétitifs des AMPARs	37 -
1.3.1.2.3.3 Ligands non compétitifs des AMPARs	38 -
1.3.1.2.3.3.1 Modulateurs allostériques positifs des AMPARs	38 -
1.3.1.2.3.3.2 Modulateurs allostériques négatifs des AMPARs	39 -
1.3.1.2.3.3.3 Bloqueurs du canal ionique des AMPARs	40 -
1.3.1.3 Les Récepteurs Kainate (KARs)	40 -
1.3.1.3.1 Structure et diversité des KARs	40 -
1.3.2 Les récepteurs métabotropiques du Glu (mGluRs)	45 -
1.3.2.3.1 Ligands des mGluRs du Groupe I	49 -
1.3.2.3.1.1 Agonistes	49 -
1.3.2.3.1.2 Antagonistes compétitifs	49 -
1.3.2.3.1.3 Antagonistes non compétitifs et modulateurs allostériques négatifs ...	50 -
1.3.2.3.1.4 Modulateurs allostériques positifs	51 -
1.3.2.3.2 Ligands des mGluRs du groupe II	51 -
1.3.2.3.2.2 Antagonistes compétitifs	52 -
1.3.2.3.2.3 Modulateurs allostériques	53 -
1.3.2.3.3 Ligands des mGluRs du groupe III	54 -
1.3.2.3.3.1 Agonistes	54 -
1.3.2.3.3.2 Antagonistes et modulateurs allostériques	55 -
1.4 Les transporteurs du Glu (GluTs)	56 -
1.4.1 Généralités	56 -
1.4.2 Structure et Fonction des EAATs	56 -
1.4.3 Structure et fonction des VGLUTs	58 -
1.4.4 Autres transporteurs du Glu	59 -
1.4.5 Pharmacologie des EAATs	59 -
1.4.5.1 Inhibiteurs des EAATs	60 -

1.4.5.2	Activateurs des EAATs	- 63 -
1.4.6	Pharmacologie des VGluTs.....	- 64 -
Chapitre 2	Principales méthodes de synthèse d'analogues du Glu	67
2.1	Synthèses à partir du L-Glu.....	67
2.2	Synthèses à partir de l'acide pyroglutamique (pGlu).....	70
2.3	Synthèse d'analogues du Glu par formation de la liaison C ² -C ³	75
2.4	Synthèse d'analogues du Glu par formation de la liaison C ³ -C ⁴	77
2.5	Méthodes chimio-enzymatiques pour la synthèse asymétrique d'analogues du Glu	80
Chapitre 3	Les aminotransférases (ATs).....	83
3.1	Diversité des aminotransférases	83
3.2	Mécanisme d'action des aminotransférase.....	86
3.3	Utilisations des ATs en synthèse organique.....	88
3.3.1	Méthodes de déplacement de l'équilibre de transamination	88
3.3.1.1	Utilisation de l'acide Aspartique (Asp) en tant que substrat donneur.....	88
3.3.1.2	Utilisation de l'acide Glutamique en tant que donneur.....	90
3.3.1.2.1	Couplage avec l'AspAT	90
3.3.1.2.2	Couplage avec la Glutamate Déshydrogénase (GluDH).....	91
3.3.1.2.3	Couplage avec l'AlanineAT (AlaAT)	91
3.3.1.2.4	Couplage avec l'orithine AT (OrnAT).....	92
3.3.1.3	Utilisation de l'Alanine (Ala) en tant que donneur	92
3.3.1.4	Utilisation de l'acide cystéine sulfinique (ACS) en tant que donneur	93
3.3.2	Principales applications des ATs.....	95
3.3.2.1	α -Aminoacides protéinogènes	95
3.3.2.2	α -Aminoacides de la série D	95
3.3.2.3	α -Aminoacides rares ou non naturels de la série L	97
3.3.2.4	Synthèse d'amines chirales	101
Chapitre 4	Travaux et résultats antérieurs	107
4.1	Synthèse d'analogues du Glu	107
4.1.1	Préparation des analogues du KG	107
4.1.1.1	Réarrangement de Claisen-Johnson	108
4.1.1.2	Utilisation de la condensation de Michael	109
4.1.1.2.1	Utilisation d'un nitroacétate	109
4.1.1.2.2	Utilisation d'un acétoacétate et ozonolyse d'acétates d'énol.....	110
4.1.1.3	Synthèse d'une série d'amides	111
4.1.1.4	Utilisation de la méthode de Wasserman	113
4.1.2	Etude et utilisation de l'AspAT.....	114
4.1.2.1	Etude cinétique	114
4.1.2.2	Procédé biocatalytique	119
4.5.3	Synthèse des analogues du Glu en utilisant l'AspAT	121
4.1.3	Synthèse d'analogues du Glu en utilisant la BCAT	123
4.1.3.1	Etudes cinétiques	123
4.1.3.2	Procédé biocatalytique	126
4.1.3.3	Synthèse d'analogues du Glu en utilisant la BCAT	128
4.2	Evaluation biologique des analogues du Glu	130
4.2.1	Etude de l'interaction des analogues du Glu avec les EAATs.....	130
4.2.2	Interaction des analogues du Glu avec les iGluRs	133

4.2.3	Essais pharmacologiques avec les mGluRs	136
-------	---	-----

PARTIE 2: PROJET

1	Principaux résultats pharmacologiques obtenus précédemment.....	139
2	Synthèse d'analogues du Glu substitués en position 4.....	140
2.1	Synthèse de nouveaux amides.....	140
2.2	Synthèse d'hydroxamates et d'un dérivé tétrazole.....	141
3	Analogue du composé L-CBG II	142
4	Nouvelle approche synthétique	142
5	Synthèse de la phosphinothricine (PPT) et de ses dérivés	143

PARTIE 3: RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1 Synthèse des analogues du KG fonctionnalisés en 4 - développement d'une nouvelle méthode de synthèse..... 147

1.1	Synthèse de la cyclohexanone I	147
1.1.1	Synthèse du 4-oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de diméthyle (4)	147
1.1.2	Synthèse du 4 oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de dibenzyle (6)	148
1.1.3	Essais pour réduire le nombre d'étapes.....	149
1.1.3.1	Synthèse du 4-oxocyclohexane-1,1,3-tricarboxylate de triméthyle (7)	149
1.1.3.2	Hydrolyse et décarboxylation du composé 7	150
1.1.3.3	Synthèse du 4-oxocyclohexane-1,1,3-tricarboxylate de 1-benzyle et de 1,3-diméthyle (9)	150
1.1.3.4	Perspectives.....	151
1.2	Préparation des carbonates d'énol II	152
1.2.1	Synthèse des carbonates d'énol isobutyliques	152
1.2.2	Synthèse du carbonate d'énol tertiobutylique 13	152
1.3	Synthèse des anhydrides mixtes carboniques III.....	153
1.4	Synthèse des amides 17-28	153
1.4.1	Synthèse de l'amide 17	154
1.4.2	Synthèse de l'amide 18	154
1.4.3	Synthèse de la série d'amides 19-23	155
1.4.4	Synthèse de la série d'amides 24- 28	156
1.5	Hydrolyse des cétoesters 17-28.....	157
1.6	Synthèse d'esters	158
1.6.1	Synthèse de l'ester propargylique 42	158
1.6.2	Synthèse des esters aromatiques activés	160
1.6.2.1	Synthèse des esters aromatiques activés 45, 46 et 47	161
1.6.2.2	Déprotection des esters activés 45-47	162
1.6.2.3	Synthèse et déprotection de l'ester du catéchol 49	163
1.6.3	Synthèse de l'ester méthylique 51.....	164
1.7	Synthèse d'hydrazide	165
1.7.1	Synthèse du 2-oxo-4-(3-oxo-3-(2-phenylhydrazinyl)propyl)pentanedioate de lithium (53).....	165
1.7.2	Préparation et déshydratation de l'acylhydrazides 54.....	166
1.7.3	Préparation et déshydratation de l'acyl hydrazide 57	167
1.8	Synthèse d'hydroxamates.....	169

1.8.1	Synthèse du 2-(3-(hydroxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle (58)	169
1.8.2	Synthèse du 2-(3-(tert-butoxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle (60)	170
1.8.3	Synthèse du 2-(3-(benzyloxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle (61)	171
1.8.4	Synthèse du 2-(3-(hydroxy(méthyl)amino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedio-ate de diméthyle (62)	171
1.8.5	Hydrolyse des cétoesters 60-62	171
1.9	Synthèse et applications d'un isocyanate	172
1.9.1	Synthèse de l'azoture d'acyle 66	172
1.9.2	Préparation de l'isocyanate 67	173
1.9.3	Synthèse et déprotection du carbamate benzylique 68	173
1.9.4	Préparation d'urées et d'amides	175
1.9.4.1	Réaction de l'isocyanate 67 avec la propargylamine	175
1.9.4.2	Réaction de l'isocyanate 67 avec l'acide acétique	175
1.10	Essai de synthèse d'une diazocétone	176
1.11	Synthèse du dérivé nitrile 73	177
1.12	Préparation d'un analogue hétérocyclique du KG comportant le cycle β -lactame ..	178
1.12.1	Travail antérieur	178
1.12.2	Nouvelle stratégie	179
1.12.3	Préparation du composé 74	179
1.12.4	Préparation des carbonates d'énol 75 et 76	180
1.12.5	Réarrangement photochimique des composés 75 et 76	180
1.12.6	Ozonolyse des composés 77 et 78	181
1.12.7	Tentative d'hydrolyse de la lactone 80	182

Chapitre 2 Synthèse d'analogues du Glu par transamination en utilisant l'AspAT d'*E.coli*

2.1	Etude de la réaction de transamination	184
2.1.1	Production de l'AspAT	184
2.1.2	Etude de l'activité de l'AspAT vis-à-vis des analogues du KG	185
2.1.2.1	Protocole de mesure de l'activité enzymatique	185
2.1.2.2	Résultats	188
2.2	Préparation des analogues du Glu	191
2.2.1	Procédé biocatalytique	191
2.2.2	Synthèse et purification des amides 82-88	194
2.2.3	Synthèse et purification des amides 89-93	194
2.2.4	Synthèse et purification de l'ester 94	195
2.2.5	Synthèse et purification de l'hydrazide 95	196
2.2.6	Synthèse et purification des hydroxamates 96-97	196
2.2.7	Synthèse de l'hydroxamate 100	197
2.2.7.1	Déprotection de l'hydroxamate 96	198
2.2.7.2	Déprotection de l'hydroxamate 97	198
2.2.8	Synthèse du carbamate 103 et déprotection	199
2.2.9	Préparation du nitrile 105 et de ses dérivés	201
2.2.9.1	Synthèse du dérivé nitrile 105	201
2.2.9.2	Réduction de la fonction nitrile	201
2.2.9.3	Protection de l'analogue du Glu 105	202

2.2.9.4	Hydrogénation du composé 108.....	203
2.2.9.5	Déprotection du composé 109.....	203
2.2.10	Synthèse du dérivé tétrazole.....	204
2.2.10.1	Synthèse du tétrazole à partir du composé 105	204
2.2.10.2	Synthèse du tétrazole à partir du composé 109	205
2.2.10.3	Protection du composé 105 par le groupement Fmoc	205
2.2.10.4	Synthèse du tétrazole à partir composé 110	205
Chapitre 3	Evaluation des propriétés biologiques des analogues du Glu	207
3.1	Etudes de l'interaction des analogues du Glu avec les EAATs	207
3.2	Interaction des analogues du Glu avec les iGluRs	209
Chapitre 4	Synthèse de la phosphinothricine et de ses dérivés	212
4.1	Introduction	212
4.2	Préparation de la PPT et ses métabolites.....	214
4.2.1	Purification de la PPT	214
4.2.2	Synthèse du PPTO.....	214
4.2.3	Synthèse du PPTOH.....	215
4.2.4	Synthèse du MPAA.....	217
4.2.4.1	Synthèse du H-phosphonate 116	218
4.2.4.2	Synthèse du composé 114	218
4.2.4.3	Déprotection du composé 114.....	219
4.2.5	Préparation du MPAA	220
4.2.5.1	Synthèse du MPAA à partir du H-phosphonate 116	220
4.2.5.2	Synthèse du MPAA à partir du phosphonite 119	220
4.2.6	Synthèse de la L-phosphinothricine	221
4.2.6.1	Synthèse de la L-PPT avec un excès de Glu	221
4.2.6.2	Synthèse de La L-PPT en utilisant le couple AspAT-ACS.....	222
4.2.6.3	Synthèse de L-PPT en utilisant les enzymes GluDH et FDH	222
4.2.7	Synthèse de la L-PPT marquée au deutérium	223
4.2.7.1	Marquage au deutérium du PPTO	223
4.2.7.2	Synthèse de la ² H-L-PPT dans H ₂ O	223
4.2.7.3	Synthèse de la ² H-L-PPT dans D ₂ O	225
4.2.8	Synthèse de la D-PPT.....	226
4.2.8.1	Utilisation du D-Glu comme donneur d'amine.....	226
4.2.8.2	Utilisation de la D-Ala comme donneur d'amine	227
4.2.9	Préparation des D et L-PPT par dédoublement cinétique avec la pénicilline acylase.....	228
Chapitre V	Evaluation biologique des métabolites de la PPT.....	231
5.1	Etudes électroencéphalographiques	231
5.2	Action des métabolites sur l'activité de la GS cérébrale.....	231
5.2.1	Dosage de l'activité GS d'extraits cérébraux <i>in vitro</i>	231
5.2.2	Inhibition <i>in vitro</i> de la GS de mouton purifiée	232
5.2.3	Dosage de l'activité de la GS d'extrait cérébraux <i>in vivo</i>	233
5.3	Interprétation des résultats	235
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		237

PARTIE 4: PARTIE EXPERIMENTALE

Généralités.....	243
Chapitre I Synthèse des analogues du KG.....	244
Pentane-1,3,3,5-(tétracarboxylate) de tétraéthyle 1	244
Acide pentane-1, 3, 5-tricarboxylique 2	244
Pentane-1,3,5-tricarboxylate de triméthyle 3	245
4-oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de diméthyle 4	245
Pentane-1,3,5-tricarboxylate de tribenzyle 5	246
4-oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de dibenzyle 6	246
4-oxocyclohexane-1,1,3-tricarboxylate de triméthyle 7	247
4-(isobutoxycarbonyloxy)cyclohex-3-ene-1,3-dicarboxylate de diméthyle 11	247
4-(isobutoxycarbonyloxy)cyclohex-3-ene-1,3-dicarboxylate de dibenzyle 12	248
4-(tert-butoxycarbonyloxy)cyclohex-3-ene-1,3-dicarboxylate de dibenzyle 13	249
Anhydride (isobutyl carbonique)-7-méthoxy-4-(méthoxycarbonyl)-6,7-dioxoheptanoïque	249
Anhydride (isobutyle carbonique)-7-benzyloxy-4-benzyloxycarbonyl-6,7-dioxoheptanoïque 15	250
Anhydride (tert-butyle carbonique) 7-benzyloxy-4-benzyloxycarbonyl-6,7-dioxoheptanoïque 16	250
2-(3-amino-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 17	251
2-(3-(méthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 18	251
2-(3-(prop-2-ynylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 19	252
2-(3-(diméthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 20	253
2-(3-(diéthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 21	253
2-(3-(pipéridin-1-yl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 22	254
2-(3-(phénylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 23	255
2-(3-(2,2-diphénylpropylamino)-3-oxopropyl)-4-oxo-glutarate de diméthyle 24	255
2-(3-(benzhydrylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 25	256
2-(3-(2,2-bis(4-méthoxyphényl)éthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle	257
2-(3-((S)-2-benzhydrylpyrrolidin-1-yl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 27	258
2-(3-((9H-xanthèn-9-yl)méthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 28	258
2-(3-(amino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 30	260
2-(3-(méthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 31	260
2-(3-(prop-2-ynylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 32	261
2-(3-(diméthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 33	261
2-(3-(diéthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 34	262
2-(3-(pipéridin-1-yl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 35	262
2-(3-(phénylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 36	263
2-(3-(2,2-diphénylpropylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 37	263
2-(3-(benzhydrylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 38	264
2-(3-(2,2-bis(4-méthoxyphényl)éthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium	264
2-(3-((9H-xanthèn-9-yl)méthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 41	265
1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-prop-2-ynyle 42	266
1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-(2,4,5-trichlorophényle) 45	266
1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-(4-nitrophényle) 46	267
1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-(4-formylphényle) 47	267
1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-(2-hydroxyphényle) 49	268

Acide 2-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 51	269
2-(3-(2-phenylhydrazinyl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 52	269
2-(3-phénylhydrazinyl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 53	270
2-(3-(2-benzoylhydrazinyl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 54	271
2-(2-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)éthyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 55	271
2,2-diphénylacetylhydrazide 56 (C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O 226,27 g/mol)	272
2-(3-(2-(2,2-diphénylacétyl)hydrazinyl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle ..	272
2-(3-(hydroxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 58	273
2-(3-(tert-butoxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 60	273
2-(3-(benzyloxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 61	274
2-(3-(hydroxy(méthyl)amino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 62	275
2-(3-(tert-butoxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 63	275
2-(3-(benzyloxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 64	276
2-(3-(hydroxy(méthyl)amino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 65	276
2-(3-azido-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 66	277
2-(2-isocyanatoéthyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 67	277
2-hydroxypipéridine-1,2,4-tricarboxylate de 1-benzyle et 2,4-diméthyle 68	278
2-(2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)ethyl)-4-oxoglutarate de dilithium 69	278
2-(2-cyanoethyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 72	279
4-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate de méthyle 74	280
4-(isobutoxycarbonyloxy)-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate de méthyle 75 ...	281
4-(tert-butoxycarbonyloxy)-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate de méthyle 76 ..	281
5-(isobutoxycarbonyloxy)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.0]hex-5-ène-6-carboxylate de méthyle	282
5-(tert-butoxycarbonyloxy)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.0]hex-5-ène-6-carboxylate de méthyle 78	282
4-méthoxy-2,7-dioxo-3-oxa-6-azabicyclo[3.2.0]heptane-4-carboxylate de méthyle 80	282

Chapitre II Synthèse des analogues de l'acide Glutamique..... 284

Protocole général de la réaction de transamination catalysée par l'AspAT d' <i>E.coli</i>	284
Protocole général de purification des analogues du Glu hydrophobes sur la résine QAE Séphadex.	284
Protocole de dosage du cétoacide résiduel pour le suivi de la transamination.....	284
Protocole de dosage du pyruvate pour le suivi de la transamination	285
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-amino-3-oxopropyl)glutamique 82	286
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-(méthylamino)-3-oxopropyl)glutamique 83	286
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-oxo-3-(prop-2-ynylamino)propyl)glutamique 84	287
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-(diméthylamino)-3-oxopropyl)glutamique 85	287
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-(diéthylamino)-3-oxopropyl) glutamique 86	288
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-oxo-3-(pipéridin-1-yl)propyl)glutamique 87	288
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-oxo-3-(phénylamino)propyl)glutamique 88	289
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-(2,2-diphénylpropylamino)-3-oxopropyl)glutamique 89	289
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-(benzhydrylamino)-3-oxopropyl)glutamique 90	290
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-(2,2-bis(4-méthoxyphényl)éthylamino)-3-oxopropyl) glutamique	290
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2-amino-4-(3-((2 <i>S</i>)-2-benzhydrylcyclopentylamino)-3-oxopropyl) glutamique 92	291
Acide (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4-(3-((9 <i>H</i> -xanthen-9-yl)méthylamino)-3-oxopropyl)glutamique 93	292
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)glutamique 94	292
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-oxo-3-(2-phénylhydrazinyl)propyl)glutamique 95	293
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-(tert-butoxyamino)-3-oxopropyl)glutamique 96	294

Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-(benzyloxyamino)-3-oxopropyl)glutamique 97	294
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-(hydroxy(méthyl)amino)-3-oxopropyl)glutamique 98 ,.....	295
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-(hydroxyamino)-3-oxopropyl)glutamique 100	296
Acide(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(2-(benzyloxycarbonylaminoéthyl)glutamique 103	296
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(2-aminoéthyl)glutamique 104	297
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(2-cyanoéthyl)glutamique 105	297
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(3-aminopropyl)glutamique 106 et Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-azépane-2,4- dicarboxylique 107	298
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-(2-cyanoéthyl)glutamique 108	299
Acide(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-(2-cyanoéthyl)glutamique 109	299
Acide (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2-(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonylamino)-4-(2-cyanoéthyl) glutamique 110	300
Chapitre III Synthèse de la PPT et de ses dérivés	301
Acide 2-amino-4-(hydroxy (méthyl)phosphoryl)butanoïque(D, L PPT)	301
Acide 4-(Hydroxy(méthyl)phosphoryl)-2-oxobutanoïque PPTO	301
Acide 2-hydroxy-4-(hydroxy (méthyl) phosphoryl) butanoïque PPTOH	302
N,N'-diisopropylcarbamimidate de benzyle 112	303
4-(benzyloxy(méthyl)phosphoryl)-2-hydroxybutanoate de benzyle 113	303
Méthylphosphinate de benzyle 116	303
3-(benzyloxy(méthyl)phosphoryl)propanoate de benzyle 114	304
Acide 3-(hydroxy(méthyl)phosphoryl)propanoïque MPPA	304
2-(benzyloxy(méthyl)phosphoryl) acétate de benzyle 118	305
Acide 2-(hydroxy(méthyl)phosphoryl) acétique MPAA	306
Acide(2 <i>S</i>)-2-amino-4-(hydroxy(méthyl)phosphoryl)butanoïque L-PPT	306
Acide (2 <i>R</i>)-2-amino-3,3-(hydroxy (méthyl) phosphoryl) butanoïque D-PPT	307
Acide (2 <i>S</i>)-2-amino-3,3-didéutérium-4-(hydroxy(méthyl)phosphoryl)butanoïque ² H ₂ - L-PPT	308
Acide (2 <i>S</i>)-2-amino-2,3,3-tridéutérium-4-(hydroxy(méthyl)phosphoryl) butanoïque ² H ₃ - L-PPT	308
Acide 4-(hydroxy(méthyl)phosphoryl)-2-(2-phénylacétamido)butanoïque PAPPT	309

Abréviations

A

aa : aminoacide

ACS : acide cystéine sulfinique

ALS : acétolactate synthétase

AMPA : acide (*S*)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-yl)propionique

AMPAR : récepteur AMPA

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

APAT : alanine:pyruvate aminotransférase

APTS : acide para-toluène sulfonique

AroAT : aromatic aminoacid AT

AspAT : aspartate aminotransférase

AT : aminotransférase

B

BCAT : branched chain aminotransferase

Bn : benzyle

BOC : *tert*-butyloxycarbonyl

BSA : albumine de sérum bovin

Bu : butyle

C

CCM: chromatographie sur couche mince

D

D-aaAT : D-aminoacid AT

DAAO : D-aminoacide oxydase

DABCO : diazabicyclo[2.2.2]octane

DBU : 1,8 diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène]

DG : diglycérade

DIEA : diisopropyléthylamine

DLT : dépression à long terme

DMAP : diméthylaminopyridine

DMP : diméthoxypropane

DMS : sulfure de diméthyle

DO : densité optique

E

EAAT : transporteur d'acides aminés excitateurs

E. coli : *Escherichia coli*

ed : excès diastéréoisomérique

F

FDH : formate déshydrogénase

G

GABA : acide γ -aminobutyrique

GABA-AT : γ -aminobutyrate-AT

GluDH : glutamate déshydrogénase

GluR : récepteur du Glu

GluT : transporteur du Glu

GPCR : récepteur couplé aux protéines G

GS : glutamine synthase

H

HPA : homophénylalanine

I

IBCF : chloroformate d'isobutyle

iBu : isobutyle

iGluR : récepteur ionotropique du glutamate

iPn : isopentyle

iPr : isopropyle

IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate

IR : infrarouge

K

KA : acide kainique / kainate

KAR : récepteur Kainate

KG : acide α -céto glutarique

KHMDS : hexaméthylidisilazane de potassium

L

LDA : diisopropylamidure de lithium

LDH : lactate déshydrogénase

LHMDS : hexaméthylidisylilamidure de lithium

LICA : N-isopropyl-cyclohexyl amidure de lithium

LTMP : tétraméthylpipéridide de lithium

M

mGluR : récepteur métabotrope

MPPA : acide 3-(hydroxy(méthyl)phosphoryl)propanoïque

MPAA : acide 2-(hydroxy(méthyl)phosphoryl) acétique

N

NAAG : acide N-acétyl aspartyl glutamique

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

NAla : naphtylalanine

NBz : p-nitrobenzoyle

NAM : modulateur allostérique négatif

NMDA : N-méthyl-D-Asp

NMDAR : récepteur NMDA

NMM : N-méthylmorpholine

O

OA : oxaloacétate

OrnAT : ornithine aminotransférase

P

PA : pénicilline acyclase

PA : potentiel d'action

PAM : modulateur allostérique positif

PAPPT : acide 4-(hydroxy(méthyl)phosphoryl)-2-(2-phénylacétamido)butanoïque

PDB : protein data bank

PEG : polyéthylèneglycol

Pf : 9-phénylfluorényle

Pi : phosphate inorganique

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLC : phospholipase C

PLP : phosphate de pyridoxal

PLT : potentialisation à long terme

PMP : pyridoxamine

Pn : pentyle

PPT : phosphinothricine

PPTO : acide 4-(Hydroxy(méthyl)phosphoryl)-2-oxobutanoïque

PPTOH : acide 2-hydroxy-4-(hydroxy (méthyl) phosphoryl) butanoïque

Q

QUIS : acide quisqualique

R

Réf : référence

S

SM : spectrométrie de masse

SNC : système nerveux central

T

Ta : température ambiante

TBDMS : tert-butyl-diméthylsilyle

TBS : tert-butyl-diphénylsilyle

tBu : *tert*-butyle

Tf : triflyle, triflorométhane sulfonyle

THF : tétrahydrofurane

TK : transcétolase

TMS : triméthylsilyle

Tr : trityle, triphénylméthyle

V

VGluT : transporteur vésiculaire du Glu

BIBLIOGRAPHIE

Introduction

Cette étude bibliographique se compose de quatre grandes parties :

La première partie est consacrée à la description du système glutamatergique, et du rôle de l'acide Glutamique (Glu) dans le système nerveux central (SNC) des vertébrés. Les principaux ligands des différents acteurs du système glutamatergique sont décrits dans cette partie ainsi que leur action ou leurs potentialités thérapeutiques pour le traitements de nombreux désordres du SNC.

Le deuxième chapitre est consacré aux principales méthodes décrites dans la littérature permettant la préparation stéréosélective d'analogues du Glu. Le chapitre 3 donne une description des aminotransférases (ATs) et des principales stratégies employées pour la mise au point de procédés biocatalytiques économiquement viables. Des applications récentes des ATs sont présentées à titre d'exemple.

Enfin, le chapitre 4 relate les travaux antérieurs à ma thèse, réalisés au laboratoire et portant sur la synthèse d'analogues du Glu par transamination enzymatique aussi que l'évaluation de l'activité de ces molécules vis-à-vis de certains acteurs du système glutamatergique.

Chapitre 1 Le système Glutamatergique

1.1 Importance physiologique du Glu

L'acide L-glutamique (Glu), est l'un des 20 aminoacides naturels constituant les protéines, il joue un rôle clé dans le métabolisme de tout être vivant sur Terre. Dans plusieurs voies métaboliques, il est souvent associé à deux de ses analogues structuraux : l'acide α -cétoglutarique (KG) et la Glutamine (Gln) comme l'illustre le schéma ci-dessous.

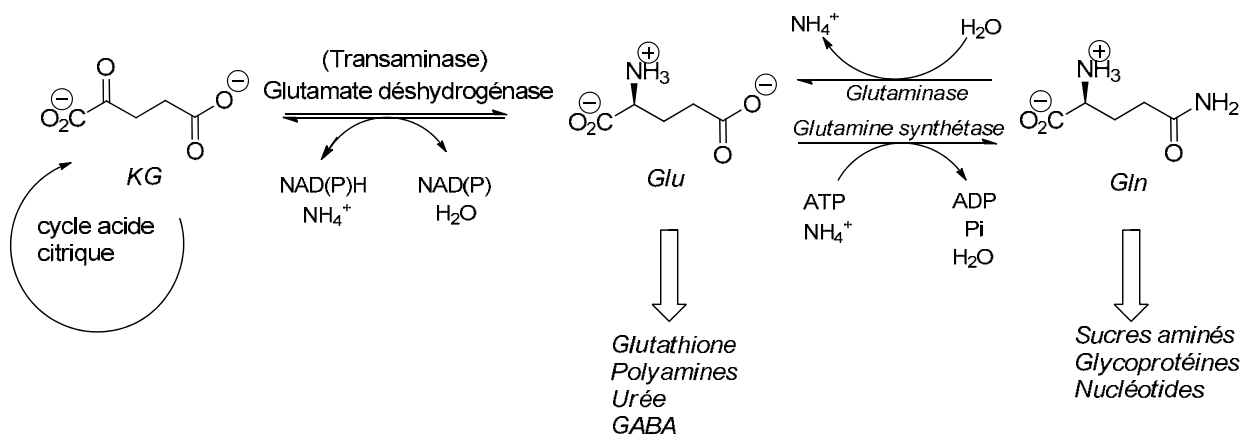


Schéma 1: rôle du Glu dans le métabolisme de l'azote

Le KG, principalement issu du cycle de KREBS est converti en Glu par amination réductrice catalysée par la Glutamate déshydrogénase ou par transamination. Le Glu peut à son tour, former la Gln par incorporation d'ammoniac sous l'action de la glutamine synthase (GS). Ces deux enzymes sont présentes chez tous les êtres vivants. Le Glu et la Gln sont donc des sources d'azote qui contribuent à la synthèse de nombreuses molécules essentielles à la vie comme les protéines et les acides nucléiques. La figure ci-dessous montre le rôle central et complexe du Glu dans le métabolisme humain :

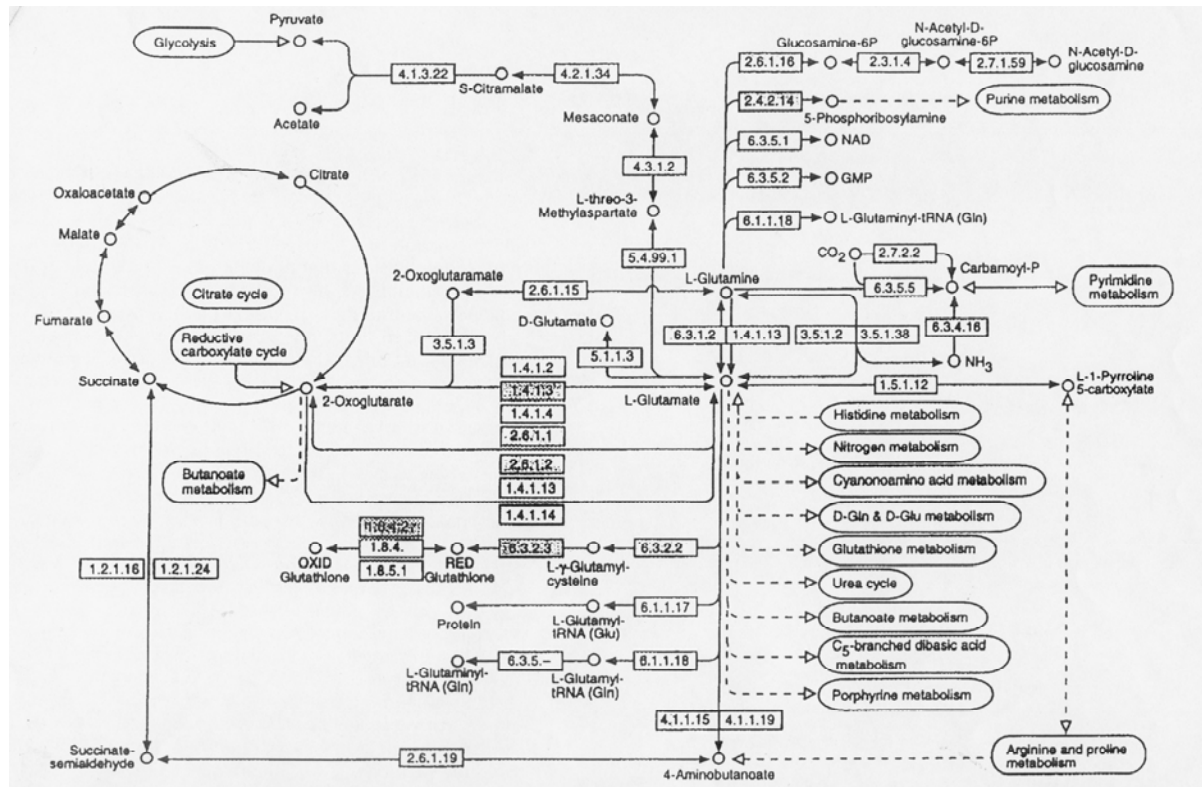


Figure 1 : Carte métabolique du Glu (GenomeNet Database Service : www.genome.ad.jp)

Il est apparu, au cours des dernières décennies, que le Glu possède un rôle fondamental dans SNC, où il est aujourd'hui reconnu comme le principal neurotransmetteur excitateur.^{1,2,3,4} D'autre part, il paraît également impliqué dans la communication cellulaire au niveau périphérique.⁵ Ainsi le Glu joue un rôle au niveau de l'os⁶, du cœur⁷, du pancréas, du foie, organes dans lesquels on trouve des récepteurs spécifiques du Glu. De plus, le Glu possède un rôle au niveau du système immunitaire⁸ ou il peut agir comme immunomodulateur.⁹ Enfin l'acide glutamique est responsable de l'un des cinq goûts de base, dénommé par le mot Japonais UMAMI (qui signifie "délicieux").¹⁰ Il existe ainsi des récepteurs sensoriels spécifiques du Glu au niveau de la langue.

¹ J. C. Watkins *Biochem. Soc.* **2000**, 28, 297-310.

² M. Nedergaard, T. Takano, A. J. Hansen *nat. rev. neurosci.* **2002**, 748-755.

³ C. J. Watkins, D. E. Jane *Br j. Pharmacol.* **2006**, 147, S100-S108.

⁴ David E. Featherstone *Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 4-12.

⁵ E. Hinoi, T. Takarada, T. Ueshima, Y. Tsuchihashi, Y. Yoneda *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 1-13.

⁶ T. Takaradal, Y. Yoneda *J. Pharmacol. Sci* **2008**, 106, 536 – 541.

⁷ S. Gill, J. Veinot, M. Kavanagh, O. Pulido *Toxicol. Pathol.* **2007**, 35:411-417.

⁸ A. A. Boldyrev, D. O. Carpenter, P. Johnson *J. Neurochem.* **2005**, 95, 913-918.

⁹ R. Pacheco, T. Gallart, C. Lluís, R. Franco *J. Neurochem.* **2007**, 185, 9-19

¹⁰ C. McCabe, E. T. Rolls *Eur. J. Neurosci.* **2007**, 25, 1855-1864.

1.2 Le système Glutamatergique du SNC

Le Glu joue un rôle dans la transduction du signal au niveau de la terminaison des cellules nerveuses c'est-à-dire des synapses chimiques de type excitatrice. Sa concentration dans le cerveau est de l'ordre de 5 à 15 mmol/kg et on le trouve principalement dans les neurones. Sa concentration est d'ordre micromolaire dans le domaine extracellulaire alors qu'elle peut atteindre une centaine de millimolaires à l'intérieur des vésicules synaptiques.

Le Glu est essentiellement produit par transamination à partir du KG dans les neurones et les cellules gliales. La figure suivante décrit le parcours du Glu au sein d'une synapse.

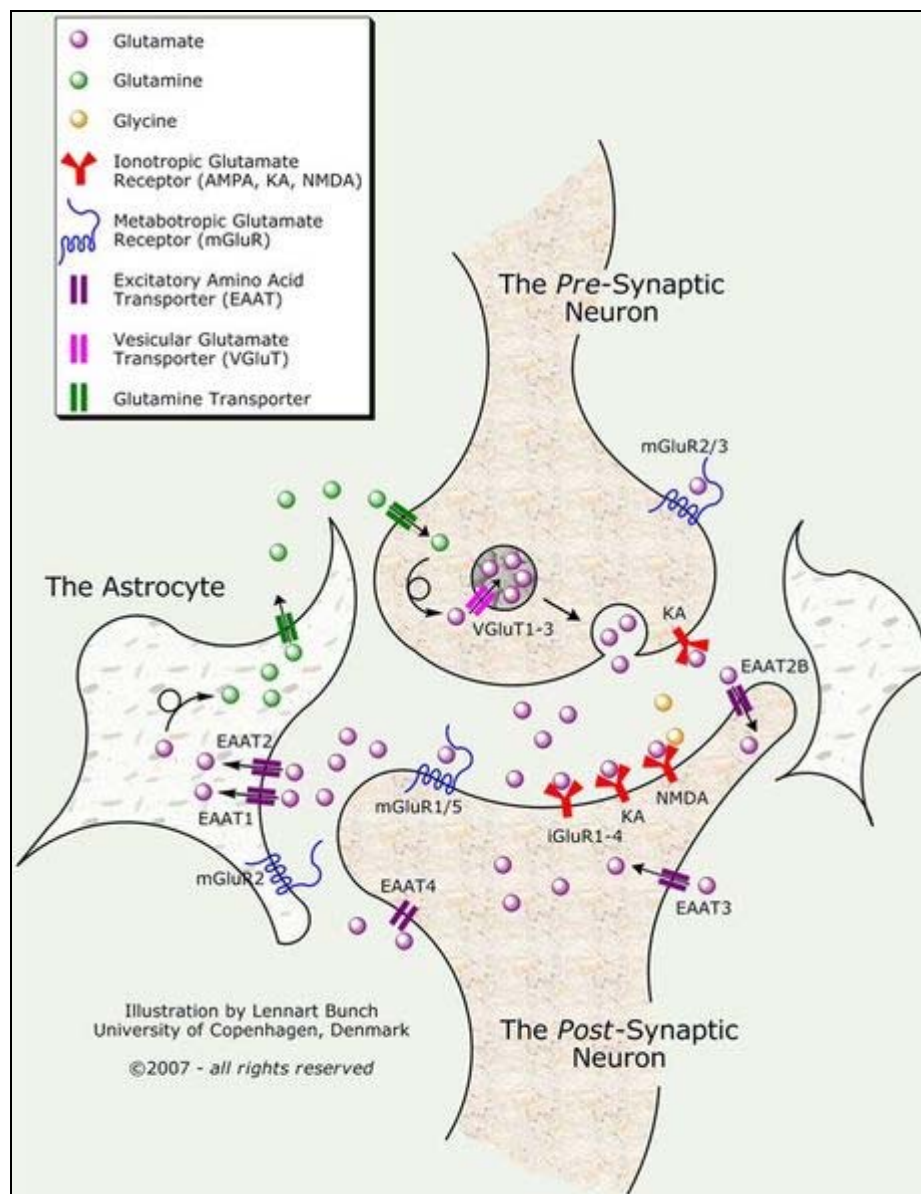


Figure 2 : transmission d'information au niveau d'une synapse chimique du SNC

Dans les cellules gliales (dont les astrocytes), le Glu est converti en Gln avant d'être libéré dans le domaine extracellulaire. La Gln diffuse jusqu'au neurone où elle sera internalisée par des transporteurs spécifiques puis reconvertie en Glu. Les molécules de Glu sont transportées par des protéines spécifiques (**VGluT**) dans les vésicules synaptiques où elles sont stockées. L'arrivée d'un potentiel d'action au niveau des terminaisons axoniques déclenche une série d'événements conduisant à la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique et à la libération du Glu dans l'espace extracellulaire (fente synaptique) où la concentration du Glu passe alors de quelques μM à environ 1 mM.

Le Glu libéré diffuse dans la fente synaptique et agit sur des récepteurs spécifiques localisés à la surface des neurones postsynaptique, présynaptique ou encore sur des astrocytes. Il existe une variété de récepteurs du Glu. Le premier type correspond aux récepteurs ionotropiques (**iGluR**). L'activation de ces récepteurs est liée à l'ouverture de canaux ioniques et produit des variations de concentration d'ions de part et d'autre de la membrane qui induisent un nouveau potentiel d'action (PA). Le Glu peut aussi se fixer sur des récepteurs de type métabotropiques (**mGluR**). Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) dont l'activation entraîne une cascade de réactions biochimiques. La recapture du Glu est assurée par des transporteurs membranaires (**EAAT** = excitatory amino acid transporters) localisés aussi bien sur les neurones que sur les cellules gliales.

L'action du Glu est conditionnée par sa concentration dans le milieu extracellulaire, la durée de sa présence dans cet espace et par la nature et la densité des récepteurs présents. Ainsi une concentration trop élevée en Glu dans la fente synaptique peut entraîner une suractivation des iGluRs qui peut aboutir à la mort des neurones. Ce phénomène est connu sous le nom d'excitotoxicité et est notamment à l'origine des lésions cérébrales consécutives à l'ischémie ou à divers accidents cérébraux. Les EAATs jouent donc un rôle primordial en captant et en éliminant rapidement le Glu de l'espace extracellulaire.

Le tableau ci-dessous présente les différents types de récepteurs du Glu existant dans le SNC. Il existe 3 grands types d'iGluRs et trois groupes de mGluRs. De plus, chaque récepteur correspond à l'assemblage de différents types de sous-unités qui apparaissent dans le tableau 1.

Récemment une nouvelle nomenclature des iGluRs a été proposée (noms entre parenthèse dans le **tableau 1**).¹¹ Nous avons adopté cette nomenclature pour la suite.

¹¹ G. L. Collingridge, R. W. Olsen; J. Peters, M. Spedding *Neuropharmacology* **2009**, 56, 2-5.

RECEPTEURS DU GLUTAMATE : GluR					
Récepteurs ionotropiques : iGluR			Récepteurs métabotropiques : mGluR		
NMDA	AMPA	Kainate	Groupe I	Groupe II	Groupe III
<i>NR1, (N1)</i>	<i>GluR1 (A1)</i>	<i>GluR5 (K1)</i>			
<i>NR2 A-D,</i>	<i>GluR2 (A2)</i>	<i>GluR6 (K2)</i>			<i>mGluR4 a-b</i>
<i>(N2 A-D)</i>	<i>GluR3 (A3)</i>	<i>GLuR7 (K3)</i>	<i>mGluR1 a-d</i>	<i>mGluR2</i>	<i>mGluR6</i>
<i>NR3 A-B,</i>	<i>GluR4 (A4)</i>	<i>KA-1 (K4)</i>	<i>mGluR5 a-b</i>	<i>mGluR3</i>	<i>mGluR7 a-b</i>
<i>(N3 A-B)</i>		<i>KA-2 (K5)</i>			<i>mGluR8 a-b</i>

Tableau 1 : nomenclature des récepteurs du Glutamate.

Les récepteurs et les transporteurs du Glu sont des éléments clés dans l'activité et la régulation des réseaux neuronaux dont le dysfonctionnement est impliqué dans de nombreuses maladies et troubles du SNC comme l'épilepsie, les maladies de Parkinson, d'Huntington, d'Alzheimer, la schizophrénie, la dépression, l'anxiété, les phénomènes d'addiction, etc. De nombreuses études ont porté sur la préparation de molécules ayant des activités agonistes ou antagonistes sélectives des récepteurs et transporteurs du Glu. Ces molécules constituent des outils précieux pour l'étude et la compréhension du fonctionnement du SNC. Elles offrent aussi un important potentiel thérapeutique pour lutter contre les divers troubles du SNC.

1.3 Les récepteurs spécifiques du glutamate

Comme nous l'avons précédemment évoqué, les récepteurs du Glu se divisent en deux grandes catégories (**Tableau 1**): les iGluRs qui sont principalement associés à des réponses synaptiques excitatrices rapides et les mGluRs qui ont des effets régulateurs à plus long terme. Les GluRs jouent un rôle clé dans un certain nombre de processus fondamentaux qui incluent le développement neuronal et la plasticité synaptique impliquée notamment dans les mécanismes de l'apprentissage et de la mémoire.

1.3.1 Les récepteurs ionotropiques: iGluRs

Les iGluRs sont essentiellement présents dans le SNC, ils sont aussi appelés récepteurs canaux, et sont des récepteurs pour les neurotransmetteurs. Ils ont une structure complexe composée de plusieurs sous-unités protéiques qui délimitent un canal au travers de la membrane plasmique. La fixation du messenger extracellulaire (le ligand, l'agoniste) entraîne l'activation et provoque l'ouverture du canal induisant des variations de concentration d'ions de part et d'autre de la membrane et créant ainsi un courant dans la région post-synaptique des

neurones. Ils sont perméables aux ions Na^+ , K^+ et certains aux cations Ca^{2+} comme les récepteurs NMDA. Trois grand types d'iGluRs ont été découverts et dénommés d'après la découverte initiale d'agonistes sélectifs (**figure 3**): NMDA, AMPA, et Kainate. Les deux derniers types de récepteurs (AMPA et Kainate), présentent des propriétés pharmacologiques voisines et sont encore regroupés sous le terme de récepteurs non-NMDA.

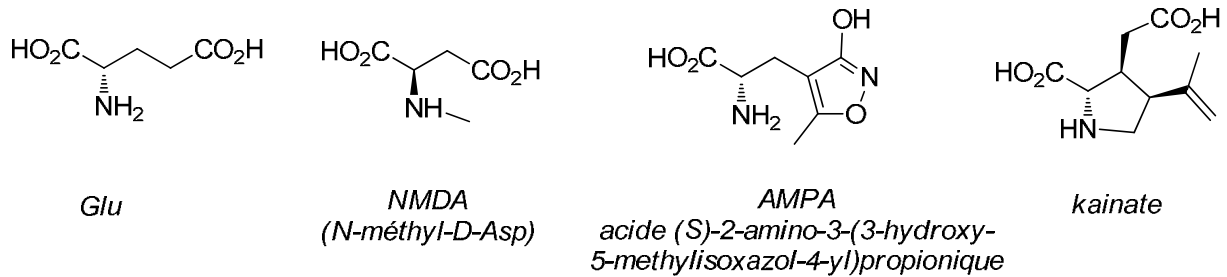


Figure 3 : structure des agonistes sélectifs des récepteurs ionotropiques.

Les iGluRs sont des assemblages tétramériques de différentes sous-unités (N1-3, GluA1-4, GluK1-5), dont la structure générale est présentée à la figure 4. Toutes les sous-unités des iGluRs partagent une topologie membranaire commune : un domaine N-terminal, un domaine de liaison du Glu constitué de 2 sous-domaines (S1 et S2), 4 hélices membranaires, et un domaine carboxy-terminal cytosolique. Le site de liaison du Glu se présente comme une poche formée par l'apposition des domaines S1 et S2 dans laquelle les atomes chargés du Glu forment des liaisons hydrogènes avec des acides aminés de la protéine. L'organisation des segments hydrophobes dans la membrane plasmique et la tétramérisation des sous-unités permet la formation d'un pore à travers lequel diffusent les ions (**figure 4**).

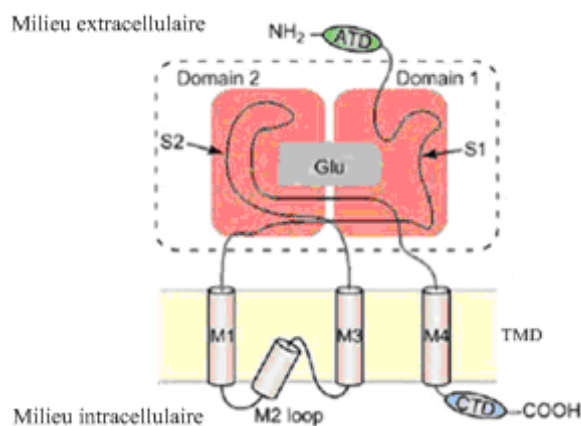


Figure 4 : structure commune aux sous-unités des iGluRs.¹²

¹² Extrait de « La distribution subcellulaire des récepteurs du glutamate de type Kainate » de F. Jaskoski, disponible en ligne sur www.123bio.net.

La connaissance de la structure tridimensionnelle des iGluRs a ouvert la voie à la conception rationnelle de composés sélectifs. Les composés sélectifs pour un type de sous-unité (ou une combinaison de sous-unités) sont utiles pour déterminer le rôle spécifique de chaque type d'iGluR dans le SNC. Ces molécules présentent aussi des potentialités thérapeutiques pour le traitement de maladies et de désordres mentaux.

1.3.1.1 Les Récepteurs NMDA (NMDARs)

1.3.1.1.1 Structure des NMDARs

La famille des NMDARs est composée par des assemblages hétérotétrameriques de différentes sous-unités : N1 (huit formes différentes générées par épissage alternatif de deux sites situés sur les domaines N et C Terminaux d'un seul gène), N2 (A – D) et N3 (A et B) qui sont produites par différents gènes. Ces différentes sous-unités présentent une structure membranaire similaire à la structure générale décrite précédemment. La combinaison des sous-unités N1 avec les différentes unités N2 et N3 génère un grand nombre de récepteurs NMDA avec différentes propriétés pharmacologiques. Les récepteurs NMDA sont les seuls, parmi les iGluRs, dont l'activation nécessite la fixation du Glu sur les sous-unités N2 mais aussi de la Glycine et/ou la D-sérine sur les sous unités N1 en tant que co-agoniste.¹³ Le fonctionnement des NMDARs nécessite ainsi la combinaison hétéromérique d'au moins une sous-unité N1 et une sous-unité N2.

L'assemblage de N3 avec N1 et N2 produit un récepteur NMDA avec des propriétés particulières : le complexe formé est activé par la glycine et non par le Glu. Ce récepteur est non perméable aux ions Ca^{2+} , résiste au blocage par les ions Mg^{2+} , et est inhibé par la D-sérine.

Des sites de phosphorylation de plusieurs résidus sérine existent sur le domaine C-terminal des NMDARs. Ces phosphorylations jouent un rôle majeur dans la régulation de la fonction des NMDARs.¹⁴

1.3.1.1.2 Fonctions des NMDARs

Au potentiel de repos, les NMDARs sont inactifs et cela, en raison du blocage des canaux ioniques par des ions Mg^{2+} même en cas de fixation du Glu. Une dépolarisation de la membrane du neurone post-synaptique (normalement réalisée par l'activation des récepteurs AMPA sensibles au Glu et produisant une réponse plus rapide que les NMDARs) permet de

¹³ N. C. Kew, J. A. Kemp *Psychopharmacology* **2005**, 179, 4-29

¹⁴ L. Wu, M. Zhuo *Neurotherapeutics* **2009**, 6, 693-702.

chasser le Mg^{2+} du canal ionique. L'activation des NMDARs conduit à l'entrée d'ions Na^+ et à la sortie d'ions K^+ mais permet aussi un influx d'ions Ca^{2+} . Cette concentration accrue du calcium intracellulaire semble être un élément clef pour l'induction de la potentialisation à long terme (PLT) qui est un processus de renforcement synaptique. Ce processus implique l'activation de protéine-kinases dont la protéine Kinase II dépendante du complexe calcium / calmoduline (CaMKII), la protéine kinase C (PKC) et la protéine Kinase A (PKA). Inversement un influx modéré d'ions Ca^{2+} lié à une fréquence de stimulation particulière peut induire un phénomène de dépression à long terme (DLT) via l'activation de phosphatases.

La PLT et la DLT sont les deux phénomènes majeurs impliqués dans la plasticité synaptique et ceci explique l'importance du rôle joué par les NMDARs.

1.3.1.1.3 Pharmacologie des NMDARs et potentialités thérapeutiques^{15,16}

L'inactivation des NMDARs présente des potentialités pour le développement de médicaments. En effet, la suractivation des NMDARs joue un rôle majeur dans le phénomène d'excitotoxicité qui se produit lors des accidents vasculaires et des lésions cérébrales qui s'accompagnent d'une libération incontrôlée du Glu dans la synapse. L'influx excessif de Ca^{2+} aboutit à l'activation d'enzymes qui dégradent les protéines, les membranes et les acides nucléiques ce qui peut conduire à la mort du neurone. Le rôle majeur et ubiquitaire des NMDARs dans le fonctionnement neuronal impose cependant des limitations aux stratégies thérapeutiques impliquant les antagonistes des NMDARs.

Deux classes d'antagonistes des NMDARs peuvent être distinguées sur la base de leur mécanisme d'action : **les antagonistes compétitifs** qui agissent sur le site de fixation du Glu, et **les antagonistes non compétitifs**. Ces derniers comprennent plusieurs types: les composés qui bloquent le canal ionique en se liant à l'intérieur de ce dernier, les antagonistes qui se lient sur le site de fixation de la glycine et les inhibiteurs allostériques qui interviennent sur d'autres sites. Ces derniers peuvent avoir un effet atténuateur en présence d'un agoniste. On parle alors de modulateurs allostériques négatifs (NAM) (**figure 5**).

¹⁵ I. G. Tikhonova, N. S. Zefirov, S. O. Bachurin *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3836-3843.

¹⁶ K. Hashimoto, *Brain Res. Rev.* **2009**, 61, 105-123.

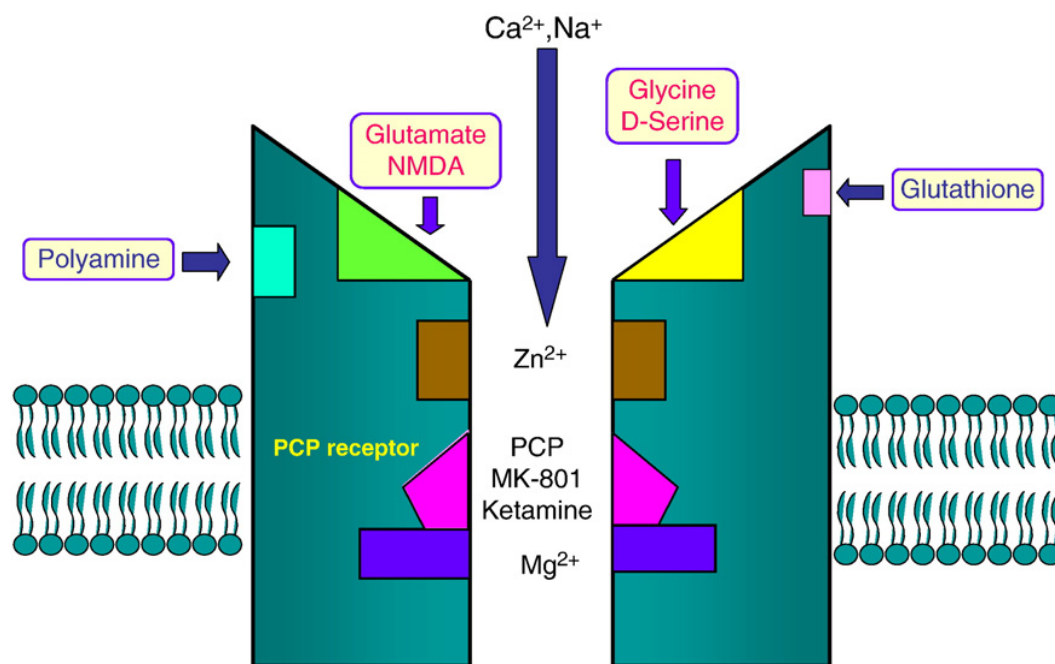


Figure 5 : les différents sites de fixation des ligands des NMDARs.¹⁶

1.3.1.1.3.1 Antagonistes compétitifs des NMDARs^{13, 14}

Des analogues du Glu possédant un groupement phosphonate à la place du groupement carboxylate de la chaîne latérale s'avèrent être des antagonistes compétitifs efficaces des NMDARs (**figure 6**). Le composé (D)-AP5 est un des antagonistes compétitifs des NMDARs les plus couramment utilisés. Il inhibe l'induction de potentialisation à long terme (PLT) dans l'hippocampe et le cortex cingulaire. Beaucoup d'antagonistes compétitifs des NMDARs rapportés à ce jour sont des analogues structuraux contraints de l'AP5, comme le CGS19755 (**figure 6**). Ces composés montrent de faibles sélectivités vis-à-vis des différentes sous-unités des NMDARs et ont une activité médiocre *in vivo* car ils ne franchissent pas efficacement la barrière hémato-encéphalique. Il existe cependant quelques exceptions comme le composé PEAQX qui est sélectif vis-à-vis des NMDARs contenant les sous-unités N1 et N2A et qui est actif *in vivo*. Nous pouvons, de même, citer le composé PPDA qui est, quant à lui, sélectif des sous-unités N2C et N2D. Récemment le WAY-129 une prodrogue du Perzinfotel (un antagoniste compétitif efficace des NMDARs) a montré une amélioration de la biodisponibilité et une activité après administration par voie orale dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique¹⁷ (douleur due à une lésion du système nerveux).

¹⁷ R. B. Baudy, M. A. Abou-Gharbia, H. Chen, W. E. Childers *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 771-778.

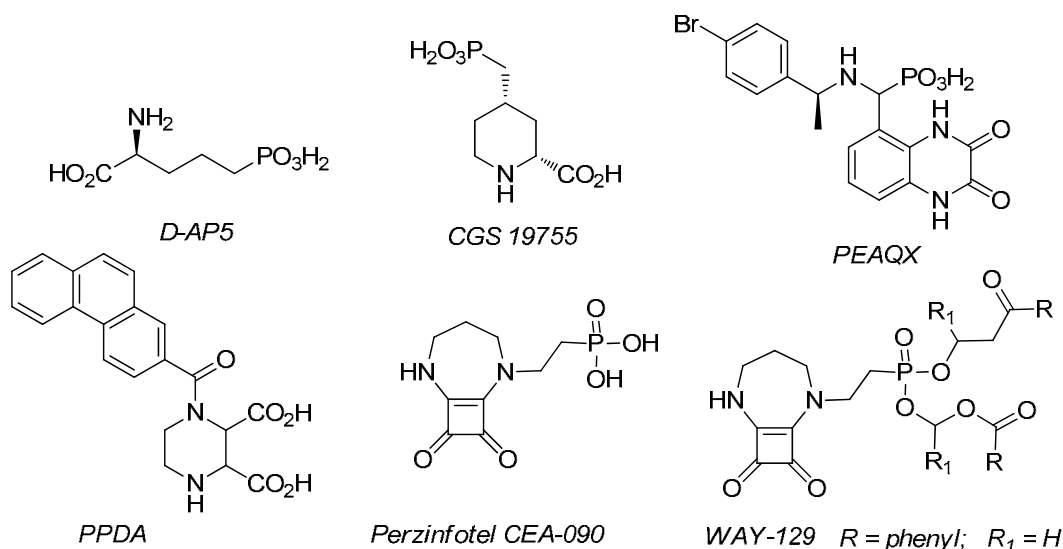


Figure 6 : exemples d'antagonistes compétitifs des NMDARs.

1.3.1.1.3.2 Antagonistes non compétitifs des NMDARs^{14, 16, 18, 19}

1.3.1.1.3.2.1 Bloqueurs des canaux ioniques

Ces composés agissent en se liant au pore du canal des NMDARs (**Figure 7**). La dizocilpine (MK-801) est l'antagoniste sélectif le plus efficace. Son administration périphérique produit un effet d'anesthésie locale et inhibe la douleur inflammatoire due au formaldéhyde.¹⁴ Cependant, *in vivo*, il induit de nombreux effets indésirables sur le comportement. La Kétamine a montré des effets antidépresseurs dans des modèles animaux et est utilisée depuis plusieurs années comme agent anesthésiant. Plusieurs études cliniques ont montré que la Kétamine présente une efficacité dans le soulagement de la douleur. La Mémantine présente, quant à elle, une plus faible affinité vis-à-vis du canal ionique des NMDARs mais celle-ci demeure supérieure à celle du Mg^{2+} . La Mémantine et la kétamine sont actuellement utilisées en clinique pour le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer. La Phencyclidine (PCP) ou la kétamine, peuvent induire chez le sujet sain des symptômes et des troubles cognitifs associés à la Schizophrénie. L'hypofonction des NMDARs est ainsi représentative de la pathologie schizophrénique. Ces deux antagonistes, avec le MK-801, montrent aussi des effets anti-convulsivant. La Kétamine, le PCP et la Mémantine génèrent cependant des effets secondaires de nature psychotomimétique (qui induisent des changements de la perception, de la pensée et du jugement) ce qui limite leur utilisation.

¹⁸ C. Villmann, C.-M. Becker *Neuroscientist* **2007**, *13*, 594-615.

¹⁹ A. Almonte, E. Murray, C. Mosley, S. F. Traynelis *J. Physiol.* **2007**, *581*, 107-128.

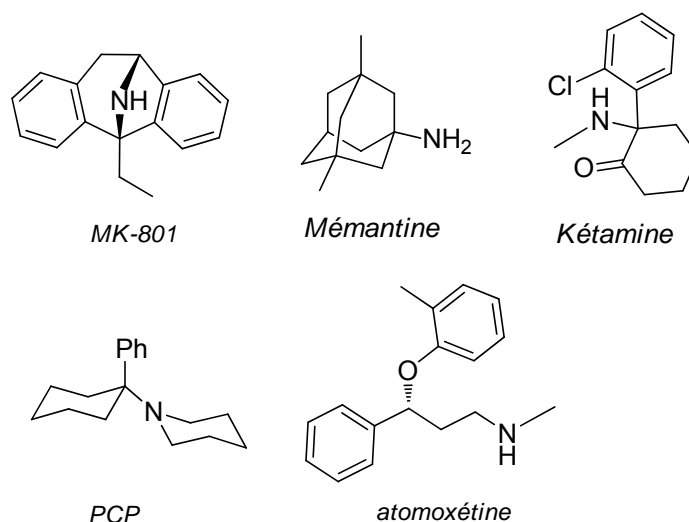


Figure 7 : antagonistes non compétitifs des NMDARs, bloqueurs de canaux ioniques.

Récemment une étude a montré que l'atomoxétine (un médicament utilisé pour traiter le déficit d'attention et l'hyperactivité) agit comme un antagoniste non compétitif des NMDARs, en interagissant vraisemblablement avec le site de fixation de Mg^{2+} situé sur la sous-unité N1.²⁰

1.3.1.1.3.2.2 Antagonistes se liant au site de la glycine^{21,22}

Parmi les antagonistes du site de fixation de la glycine des NMDARs (**Figure 8**), on compte les acides 2-carboxylindole comme GV150526 qui possède une forte affinité et une grande sélectivité. C'est un puissant agent neuroprotecteur *in vivo*. On trouve aussi des dérivés de l'acide kynurénique (un antagoniste endogène des NMDARs se liant au site de Gly) tel que L683344 qui a montré des effets neuroprotecteurs après des accidents ischémiques ou encore le 5,7 DCK qui est efficace dans des modèles animaux de douleur neuropathique.

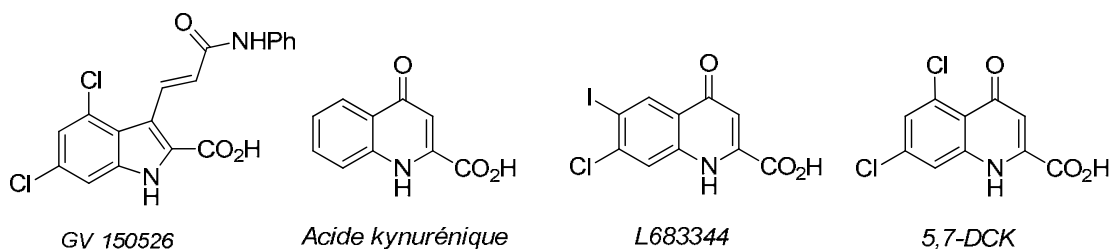


Figure 8 : antagonistes non compétitifs des NMDARs se liant au site de la glycine.

²⁰ A. G. Ludolph, P. T. Udvardi *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 160, 283-291.

²¹ F. Bordi, M. Mugnaini, A. Terron, R. Barnaby, A. Reggiani *CNS Drug Rev.* **2000**, 6, 135-152.

²² W. E. Childers; R. B. Baudy *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 2557-2562.

1.3.1.1.3.2.3 Inhibiteurs allostériques des NMDARs

Les Polyamines modulent la fonction des NMDARs. Par exemple, la spermine stimule les NMDARs en augmentant l'affinité pour la glycine.²³ D'autres amines comme l'Ifenprodil se fixent sur un autre site allostérique.²⁴ L'Ifenprodil est le premier antagoniste identifié comme sélectif des sous unités N2B. Une deuxième génération de dérivés de l'Ifenprodil a été développée incluant par exemple le Traxoprodil (CP-101,606) qui est 10 fois plus efficace que l'Ifenprodil. Ce composé a progressé jusqu'en phase II des essais cliniques pour le traitement des douleurs neuropathiques.²¹ En outre, ce composé a montré des effets antidiskinésique (traitement des désordres du mouvement) et antiparkinson (**figure 9**).²⁵

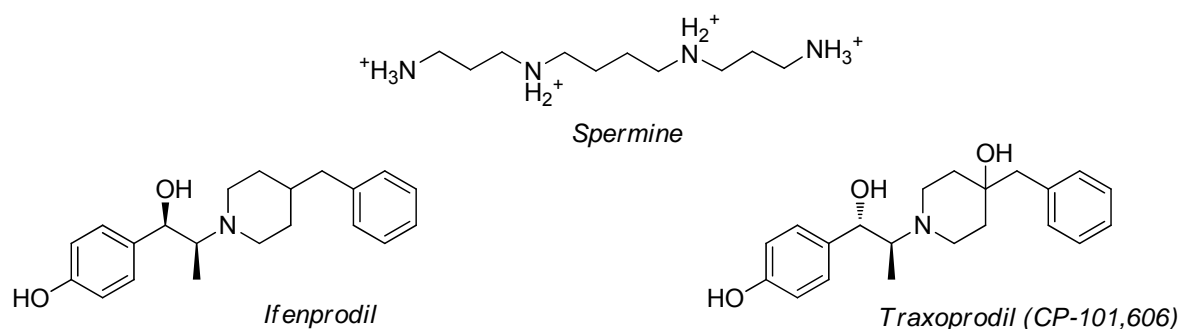


Figure 9 : antagonistes du site Polyamine.

1.3.1.2 Les Récepteurs AMPA (AMPARe)^{26, 27, 28, 29}

1.3.1.2.1 Structure des AMPARs

Les récepteurs AMPA sont des tétramères formés par la combinaison de quatre types de sous-unités GluA1-4, qui sont codées par des gènes différents. La grande majorité des AMPARs dans le SNC existent sous la forme d'hétérotétramères, dimères de dimères contenant chacun la sous unité GluA2. Les différentes sous-unités présentent une structure semblable à la structure générale des iGluRs mais avec quelques particularités (**figure 10**). Il existe notamment une région d'épissage alternatif **Flip/Flop** extracellulaire situé en amont de l'hélice transmembranaire M4. Cette région joue un rôle dans les propriétés de désensibilisation (incapacité du récepteur de passer de nouveau dans l'état activé, en dépit de la présence d'un agoniste). Ainsi une réduction et un ralentissement de la désensibilisation est observée dans le

²³ L. Mony; J. N. Kew; M. J. Gunthorpe; P. Paoletti *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 157, 1301-1317.

²⁴ M.J. Gallagher, H. Huang, D.B. Pritchett, *ASBMB*, **1996**, 271, 9603-9611

²⁵ J. G. Nutt, S. A. Gunzler, T. Kirchhoff, P. Hogarth, J. L. Weaver *Movement Disord.* **2008**, 23, 1860-1866.

²⁶ J. T. R. Isaac, M. C. Ashby, C. J. McBain *Neuron* **2007**, 54, 859-871.

²⁷ V. V. Grigoriev, A. N. Proshin, A. S. Kinzirsy, S. O. Bachurin *Russ. Chem. Rev.* **2009**, 78, 48-494.

²⁸ D. Catarzi, V. Colotta, F. Varano *Med. Res. Rev.* **2007**, 27, 239-278.

²⁹ The Glutamate Receptors, **2008** Human Press, Eds: R. W. Gereau, G. T. Swanson.

cas des AMPARs contenant la forme Flip par rapport aux AMPARs contenant la forme Flop. Il existe aussi un site **d'édition d'ARN R/G** situé dans une région qui précède immédiatement la région d'épissage alternatif **Flip/Flop**. Cette modification post-transcriptionnelle change une arginine en glycine et induit une modification des propriétés de désensibilisation des AMPARs. Un autre site **d'édition d'ARN Q/R** spécifique de la sous-unité GluA2 est situé dans le canal des AMPARs et produit le remplacement quasi systématique d'une Gln par une Arg. Ainsi un AMPAR contenant la sous-unité GluA2(**R**) est imperméable aux ions bivalents en particulier l'ion Ca^{2+} et elle possède une basse conductibilité de canal en raison de la taille et de la charge de la chaîne latérale de l'arginine. Cependant, certains interneurons, ainsi que des cellules dans des conditions physiologiques particuliers (mise en place de la PLT) présentent des AMPARs qui ne contiennent pas la sous-unité GluA2 et qui sont ainsi perméables aux ions Ca^{2+} , ce qui leur confère des propriétés tout à fait particulières.

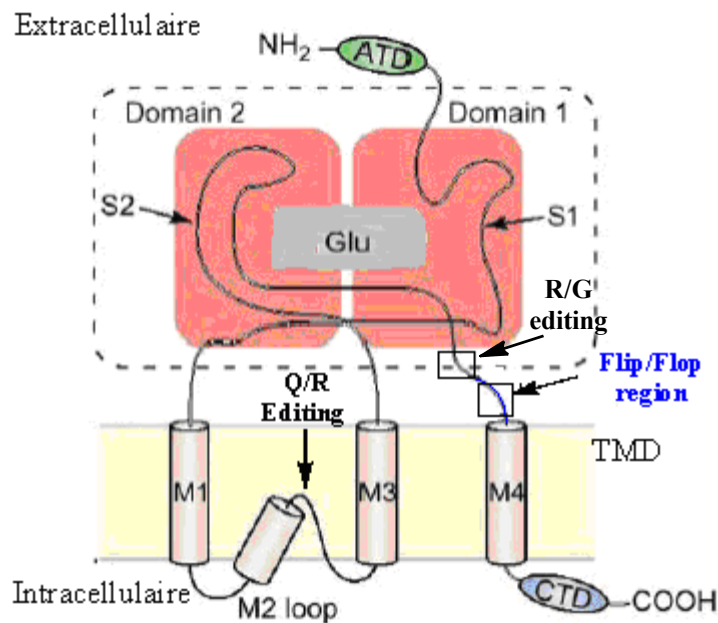


Figure 10 : schéma montrant la topologie d'une sous-unité des AMPARs.¹²

Le domaine C-terminal contient plusieurs résidus sérine qui constituent une cible pour différentes Kinases. L'activité des AMPARs est aussi directement modulée par la phosphorylation de ces résidus. Le domaine C-terminal possède aussi plusieurs sites de liaison (domaines PDZ) pour un grand nombre de protéines. L'effet de ces interactions est crucial pour la localisation et le trafic des AMPARs afin qu'ils puissent remplir leur rôle majeur dans les phénomènes de plasticité synaptique.

1.3.1.2.2 Fonction des AMPARs

Les AMPARs sont responsables de la majeure partie de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le SNC, leur modulation est le mécanisme principal qui sous-tend la plasticité synaptique. L'activation des AMPARs par le Glu libéré dans la fente synaptique déclenche l'ouverture d'un canal perméable au K^+ et au Na^+ . Ainsi, compte tenu des gradients de concentration de part et d'autre de la membrane, le potassium sort de la cellule alors que le sodium y entre. Cela produit, suite à la dépolarisation de la membrane neuronale, l'apparition d'un courant d'une durée de vie de quelques centaines de microsecondes. Cette cinétique rapide du canal des AMPARs est essentielle au fonctionnement des réseaux neuronaux. La dépolarisation membranaire du neurone postsynaptique est par ailleurs responsable de l'activation des NMDARs, qui à leur tour, vont influencer sur l'activité des AMPARs via l'influx d'ions Ca^{2+} qu'ils engendrent.

Les AMPARs sont aussi une cible importante de modifications directes au cours des phénomènes précoces de plasticité synaptique à long terme : la PLT implique une augmentation de l'activité des AMPARs qui est due notamment à la phosphorylation de la Ser 831 située sur le domaine C-terminal des sous-unités GluA1. D'autre part, au cours des phénomènes de DLT, les AMPARs sont internalisés et éliminés des synapses via la déphosphorylation de la Ser 845 située sur le domaine C-terminal de la sous-unité GluA1.²⁷

Enfin, comme nous l'avons évoqué précédemment, des AMPARs ne contenant pas la sous-unité GluA2 sont perméables aux ions Ca^{2+} . L'activation de ces récepteurs par le Glu entraîne l'ouverture du canal et par la suite un influx de Ca^{2+} . Cette variation de la concentration intracellulaire des ions Ca^{2+} peut être encore impliquée dans la plasticité synaptique.²⁴

1.3.1.2.3 Ligands des AMPARs et potentialités thérapeutiques³⁰

Différents types de ligands ont été développés et peuvent être classés en 2 catégories : d'une part, les ligands compétitifs (en particulier des antagonistes qui agissent sur le site de fixation du Glu en inhibant l'ouverture du canal) et les ligands non compétitifs comprenant les modulateurs allostériques positifs (PAM), négatifs (NAM) et les "bloqueurs" du canal ionique. Les PAMs se lient à l'interface entre les sous-unités et ralentissent la désensibilisation et / ou la désactivation du récepteur. Les NAMs se lient à proximité du domaine de liaison du Glu et du

³⁰ J. J. Fleming, P. M. England *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 1381-1387.

domaine transmembranaire et perturbent le changement conformationnel nécessaire à l'ouverture du canal. Enfin, les bloqueurs du canal ionique se fixent dans le canal ouvert du récepteur et inhibent le passage des ions (**figure 11**).

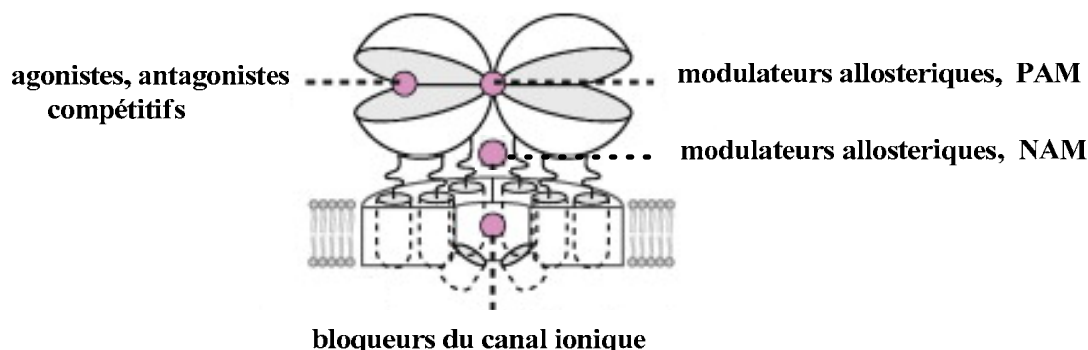


Figure 11 : sites de fixation des 4 classes de ligands des AMPARs.²⁹

1.3.1.2.3.1 Agonistes des AMPARs

L'AMPA est un agoniste qui active spécifiquement les AMPARs. Les AMPARs peuvent aussi être activés par l'acide quisqualique (QUIS) mais ce dernier, peu sélectif, active aussi certains mGluRs. On peut citer aussi la 5-Fluorowillardine qui est un agoniste sélectif des AMPARs classiquement utilisé pour stimuler les AMPARs *in vitro* (**figure 12**).³¹

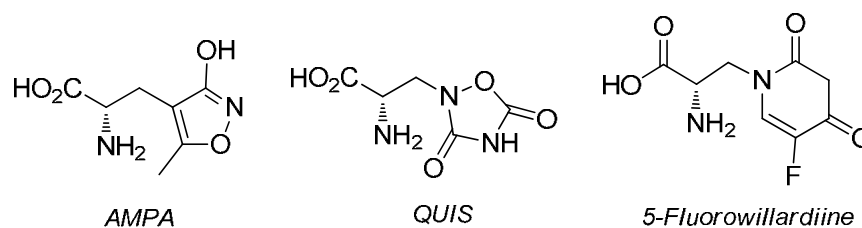


Figure 12 : agonistes compétitifs sélectifs des AMPARs

1.3.1.2.3.2 Antagonistes compétitifs des AMPARs²⁷

De très nombreuses études ont porté sur la synthèse d'antagonistes compétitifs des AMPARs et sur leurs potentialités thérapeutiques. Parmi ceux-ci, on peut citer le composé LY293558 qui s'est avéré neuroprotecteur dans un modèle focal d'ischémie et est à l'étude pour le traitement de la migraine.³² Cependant des études *in vitro* ont aussi montré une activité de ce composé vis-à-vis des récepteurs Kainates (KARs) (**figure 13**).

Les quinoxalinediones constituent une classe importante d'antagonistes compétitifs des AMPARs qui sont encore en cours d'étude afin d'améliorer leur sélectivité vis-à-vis des AMPARs ainsi que leurs propriétés pharmacocinétiques. Le CNQX est le premier antagoniste

³¹ M. Kessler; A. C. Arai *Brain Res.* **2006**, 1076, 25-41.

³² <http://clinicaltrials.gov>

efficace découvert dans cette série. Il a montré également une activité sur le site Glycine des NMDARs. Plus tard le NBQX a montré une sélectivité améliorée pour les AMPARs ainsi qu'une efficacité dans le traitement des troubles de la démyélinisation. Son développement clinique a cependant été arrêté en raison de propriétés pharmacocinétiques peu adaptées, en particulier des problèmes de solubilité.

On peut citer aussi les composés YM872 et ZK200775 qui ont montré une activité *in vivo* dans des modèles animaux d'ischémie et d'accidents vasculaires cérébraux. Le composé AMP-397A a montré une activité anticonvulsivante *in vivo*. Ce composé présente aussi une affinité importante vis-à-vis des KARs (**figure 13**).

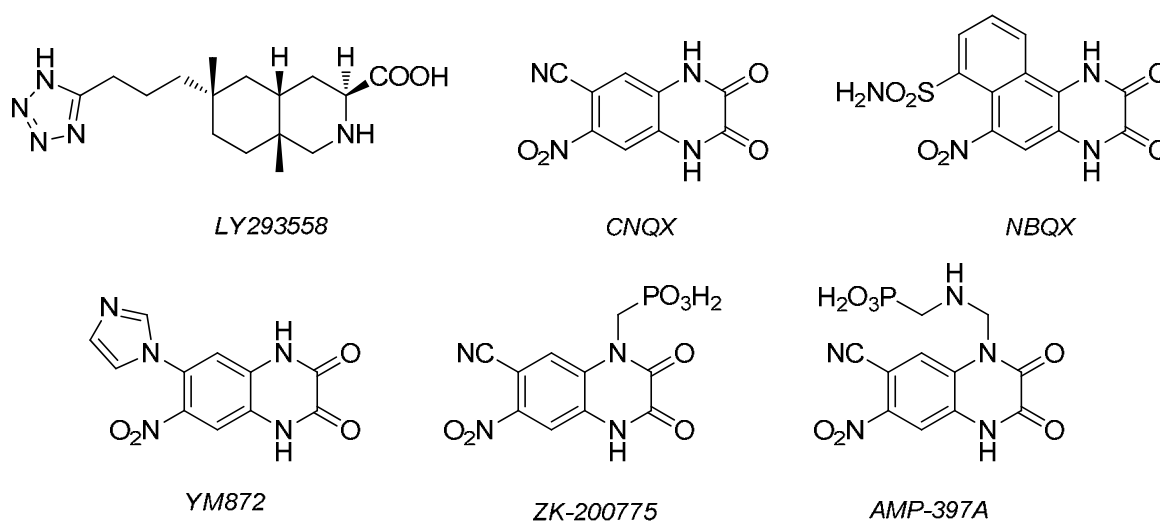


Figure 13 : antagonistes compétitifs des AMPARs.

1.3.1.2.3.3 Ligands non compétitifs des AMPARs

1.3.1.2.3.3.1 Modulateurs allostériques positifs des AMPARs²⁶

Les modulateurs allostériques positifs des AMPARs peuvent exercer des effets bénéfiques sur la mémoire et les fonctions cognitives en augmentant le courant synaptique et la PLT de la transmission synaptique. Leur action semble impliquer le ralentissement de la désensibilisation et / ou la désactivation des AMPARs.

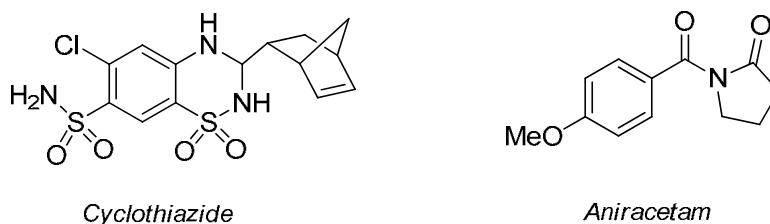


Figure 14 : exemples des modulateurs allostériques positifs des AMPARs.

On peut citer l'aniracetam (appartenant à la classe des Ampakines) et le cyclothiazide (**Figure 14**) qui potentialisent la réponse des AMPARs. Cependant, leur utilisation thérapeutique est entravée par la faible stabilité métabolique (aniracetam) et la faible pénétrabilité de la Barrière hémato-encéphalique (cyclothiazide).³³ L'aniracetam est cependant utilisé comme complément alimentaire pour ses propriétés supposées anxiolytiques et nootropiques. Plusieurs analogues de l'aniracetam ont été synthétisés. On peut citer le CX717 (structure non révélée) qui est en étude clinique de phase II pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.³⁴

1.3.1.2.3.3.2 Modulateurs allostériques négatifs des AMPARs²⁶

Nous pouvons citer l'exemple des dérivés 2,3-benzodiazépines tels que le GYKI-52466, le GYKI-53784 et le talampanel (GYKI-53773). Ces composés sont sélectifs des AMPARs, mais présentent une faible sélectivité vis à vis des sous-types des AMPARs (**figure 15**).

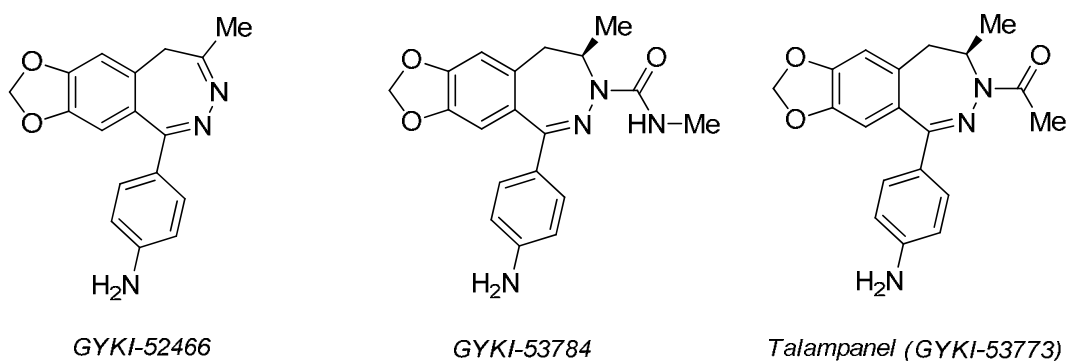


Figure 15 : exemples des modulateurs allostériques négatifs des AMPARs.

Ils pénètrent la barrière hémato-encéphalique et sont actifs après administration systémique. Le talampanel est à l'étude pour le traitement de l'épilepsie³⁵, le gliome malin³⁶ et la sclérose latérale amyotrophique qui est due à une dégénérescence des neurones moteurs du cortex cérébral et de la moelle épinière.³⁷

³³ A. Guenzi, M. Zanetti *J. Chromatogr.* **1990**, 530, 397-406.

³⁴ S. E. Ward, B. D. Bax, M. Harries *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 160, 181-190.

³⁵ J.J. Luszczki *Pharmacol. Rep.* **2009**, 61, 197-216.

³⁶ F. M. Iwamoto, T. N. Kreisl, H. A. Fine *Cancer* **2010**, 116, 1776-1782.

³⁷ <http://clinicaltrials.gov>

1.3.1.2.3.3.3 Bloqueurs du canal ionique des AMPARs²⁹

Des toxines Polyamines présentes dans les venins de guêpes et d'araignées inhibent sélectivement les AMPARs qui n'ont pas la sous-unité GluA2. Ces polyamines se lient dans le canal ionique inhibant ainsi le passage des ions Ca^{2+} . Par exemple, les produits naturels JSTX-3 (joro spider toxin) et l'argiotoxine-636 (ArgTx-636) (**figure 16**) bloquent les canaux ioniques des AMPARs homomériques formés par les sous-unités GluA1, GluA3 et GluA4. L'utilisation des ces molécules et d'analogues synthétiques pourrait être utile dans le traitement des troubles neurodégénératifs en réduisant les dommages neurologiques associées à la surconcentration des ions Ca^{2+} .

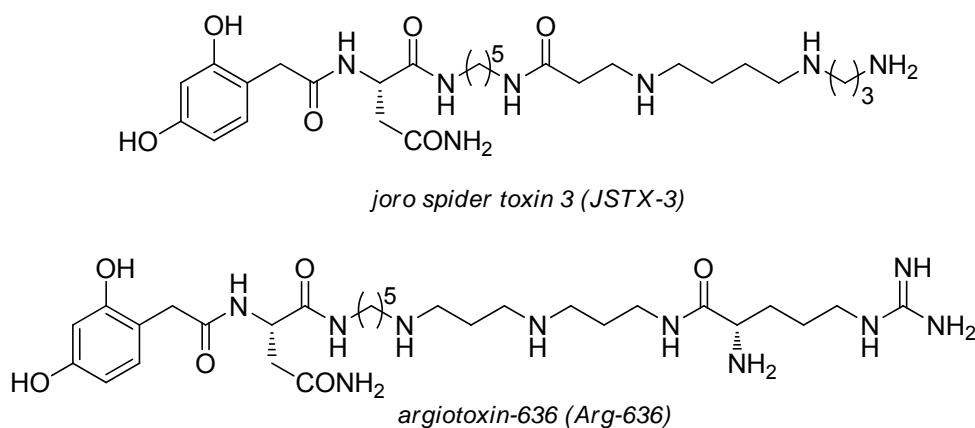


Figure 16 : exemples de toxines polyamines naturelles bloquant les canaux ioniques des AMPARs.

1.3.1.3 Les Récepteurs Kainate (KARs)

1.3.1.3.1 Structure et diversité des KARs³⁸

La topologie membranaire des KARs est similaire aux AMPARs et NMDARs. Deux classes de sous-unités codées par 5 gènes différents ont été identifiées. Le premier groupe est constitué par les sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3. Le deuxième contient les sous-unités GluK4 et GluK5. Les sous-unités GluK1-3 présentent 75 à 80% d'homologie dans leurs séquences d'acides aminés. Ces sous-unités forment des récepteur homomériques ou hétéromériques activés par le Glu et présentant une faible affinité pour le KA. Les sous-unités GluK4 et GluK5 présentent 68% d'homologie, et forment des récepteurs hétéromériques avec au moins une sous-unité de type GluK1-3. Elles présentent une forte affinité pour le KA. Les deux classes présentent entre elles un taux d'homologie de 45%.

³⁸ P. Pinheiro, C. Mulle *Cell Tissue Res.* **2006**, 326, 457-482.

Comme dans le cas des AMPARs, les ARNm codant pour les sous-unités des KARs subissent des modifications post-transcriptionnelles d'édition et / ou d'épissage alternatif. Les épissages alternatifs des sous-unités des KARs se situent dans le domaine C-terminal à l'exception de l'épissage d'un exon codant pour 15 acides aminés dans le domaine N-terminal (**figure 17**).

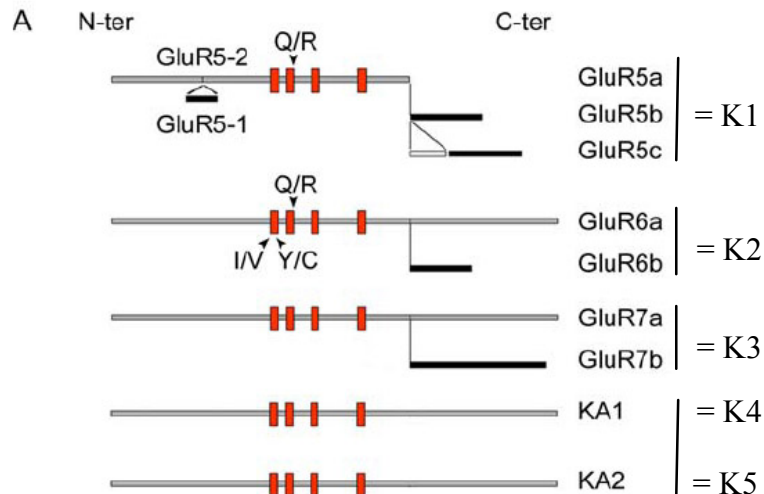


Figure 17 : différents isoformes des sous-unités formant les récepteurs kainate.³⁷

Les propriétés pharmacologiques des sous-types des KARs ne semblent pas être affectées par l'épissage alternatif dans le domaine C-terminal. Mais ces modifications ont un fort impact sur le trafic intracellulaire et les processus de régulation des KARs via des interactions protéiques. En effet, comme pour les autres récepteurs du Glu, les KARs contiennent à leur extrémité C-terminale un motif de liaison PDZ, qui peut se lier à différentes protéines. En outre, le domaine C-terminal des KARs présente aussi des sites de phosphorylation qui participent à la régulation de l'activité du canal ionique.

Comme les sous-unités GluA2 des AMPARs, les sous unités GluK1 et GluK2 peuvent être éditées au niveau du site Q/R du second segment membranaire, ce qui comme pour les AMPARs, peut fortement modifier la conductance élémentaire du canal et sa sélectivité ionique vis à vis des cations Ca^{2+} (**figures 10 et 17**).

Deux autres résidus peuvent être modifiés sur la sous-unité GluK2 par l'édition d'ARN: une isoleucine (I) est remplacée par une valine (V) au site I/V et une tyrosine (Y) est remplacée par une cystéine (C) au site Y/C (**figure 17**). Ces modifications induisent aussi des changements de conductance et de perméabilité aux ions Ca^{2+} .

Contrairement aux sous-unités GluK1-3, les GluK4 et GluK5 ne subissent pas de processus d'édition et ou d'épissage alternatif.

1.3.1.3.2 Fonctions des KARs³⁷

La connaissance du rôle physiologique des KARs est encore peu avancée comparativement aux autres iGluRs. Il apparaît cependant que les KARs jouent un rôle majeur dans la régulation de l'activité des réseaux neuronaux et qu'ils exercent des fonctions multiples. Cette diversité fonctionnelle est en relation avec l'hétérogénéité de ces récepteurs (liée à l'assemblage variable des différents types de sous-unités et de leur variants). De plus, la localisation dans le SNC et au niveau subcellulaire, pré- ou post-synaptique conditionne la fonction des KARs.

Au niveau post-synaptique, les KARs participent à la transmission synaptique excitatrice. Les observations en conditions physiologiques ont cependant montré une cinétique plus lente et une amplitude plus faible que dans le cas des AMPARs. Les KARs post-synaptiques semblent aussi jouer un rôle dans la régulation de l'excitabilité neuronale.

De nombreuses études portant en particulier sur certaines synapses de l'Hypocampe (MF-CA3) ont montré au niveau pré-synaptique que les KARs ont un rôle d'autorécepteurs facilitant la libération du Glu dans des conditions de stimulation particulières. Cet effet pourrait-être lié à une dépolarisation membranaire et / ou à un influx d'ions Ca^{2+} directement via les KARs. Ces récepteurs participeraient aussi à une forme de plasticité synaptique (PLT) indépendante des NMDARs. Dans d'autres régions du cerveau, l'activation des KARs présynaptiques aurait un effet inverse en réduisant la libération du Glu. L'expression de ces récepteurs semble par ailleurs très dépendante du stade de développement du réseau neuronal.

Les KARs semblent aussi jouer un rôle d'hétérorécepteurs et participent notamment à la régulation de la libération du GABA (neurotransmetteur inhibiteur) au niveau de neurones GABAergiques.

Enfin il semblerait que certaines fonctions des KARs soient assurées via un mécanisme métabotrope direct des KARs impliquant une interaction avec des protéines G.

1.3.1.3.3 Ligands des KARs et potentialités thérapeutiques^{39, 40}

Une difficulté majeure dans l'étude des fonctions des récepteurs kainate a été l'incapacité de distinguer entre les sous-unités des KARs, mais aussi la différenciation entre les KARs et les AMPARs. Cependant, de nombreux travaux ont été réalisés durant ces dernières années concernant la synthèse de ligands (agonistes et antagonistes) sélectifs des différentes sous-unités pour élucider les rôles spécifiques des KARs.

1.3.1.3.3.1 Agonistes des KARs

L'agoniste prototypique des KARs est le Kainate (KA) isolé de l'algue *Digenea Simplex*. D'autres agonistes d'origine naturelle présentent une structure hétérocyclique proche de celle du KA. On peut citer l'acide Domoïque (DOMO), et les acides acroméliques (ACRO A et B). Ces molécules présentent pas ou peu de sélectivité pour les différentes sous-unités des KARs.

Plus récemment, des agonistes plus sélectifs ont été synthétisés et ont montré une sélectivité pour les sous-unités GluK1. Ainsi l'ATPA et la (S)-iodowillardine (5-I-WILLA) présentent une grande affinité pour les récepteurs homomériques GluK1, et sont aussi des agonistes partiels pour d'autres sous-types des KARs. On peut aussi citer la Dysiherbaine (DH) et la neodysiherbaine (NDH) qui ont montré une sélectivité pour les sous-unités GluK1 et GluK2 et une affinité moyenne pour les assemblages hétéromériques GluK5/GluK1.^{41, 42, 43} L'analogue (2S,4R)-4-méthyl-Glu (SYM2081) a montré une affinité pour les récepteurs homomériques GluK1 et GluK2. Ce composé est par ailleurs souvent utilisé comme un antagoniste fonctionnel des KARs car il peut durablement désensibiliser ces récepteurs. Dans la série des analogues de SYM2081 on peut citer les composés LY339434⁴⁴, ES 319 et ES 287⁴⁵, qui ont montré une grande affinité et une sélectivité pour GluK1 par rapport à GluK2 et GluK3. Dans le cas des deux derniers dérivés l'activité agoniste ou antagoniste reste cependant à déterminer (**figure 18**).

³⁹ D. E. Jane, D. Lodge, G. L. Collingridge *Neuropharmacology* **2009**, 56, 90-113.

⁴⁰ L. Bunch, P. Krogsgaard-Larsen *Med. Res. Rev.* **2009**, 29, 3-28.

⁴¹ R. Sakai, H. Kamiya *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 296, 650-658.

⁴² J. M. Sanders, G. T. Swanson *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 314, 1068-1078.

⁴³ G. T. Swanson, F. S. Heinemann *Neuron* **2002**, 34, 589-598.

⁴⁴ B. Small, J. Thomas K. Hoo, M. Deverill, Pedregal; D. Bleakman *Neuropharmacology* **1998**, 37, 1261-1267.

⁴⁵ E. Sagot, D. S. Pickering, X. Pu, M. Umberti, T. B. Stensbol, B. Nielsen, M. Chapelet, J. Bolte, T. Gefflaut, L. Bunch *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4093-4103.

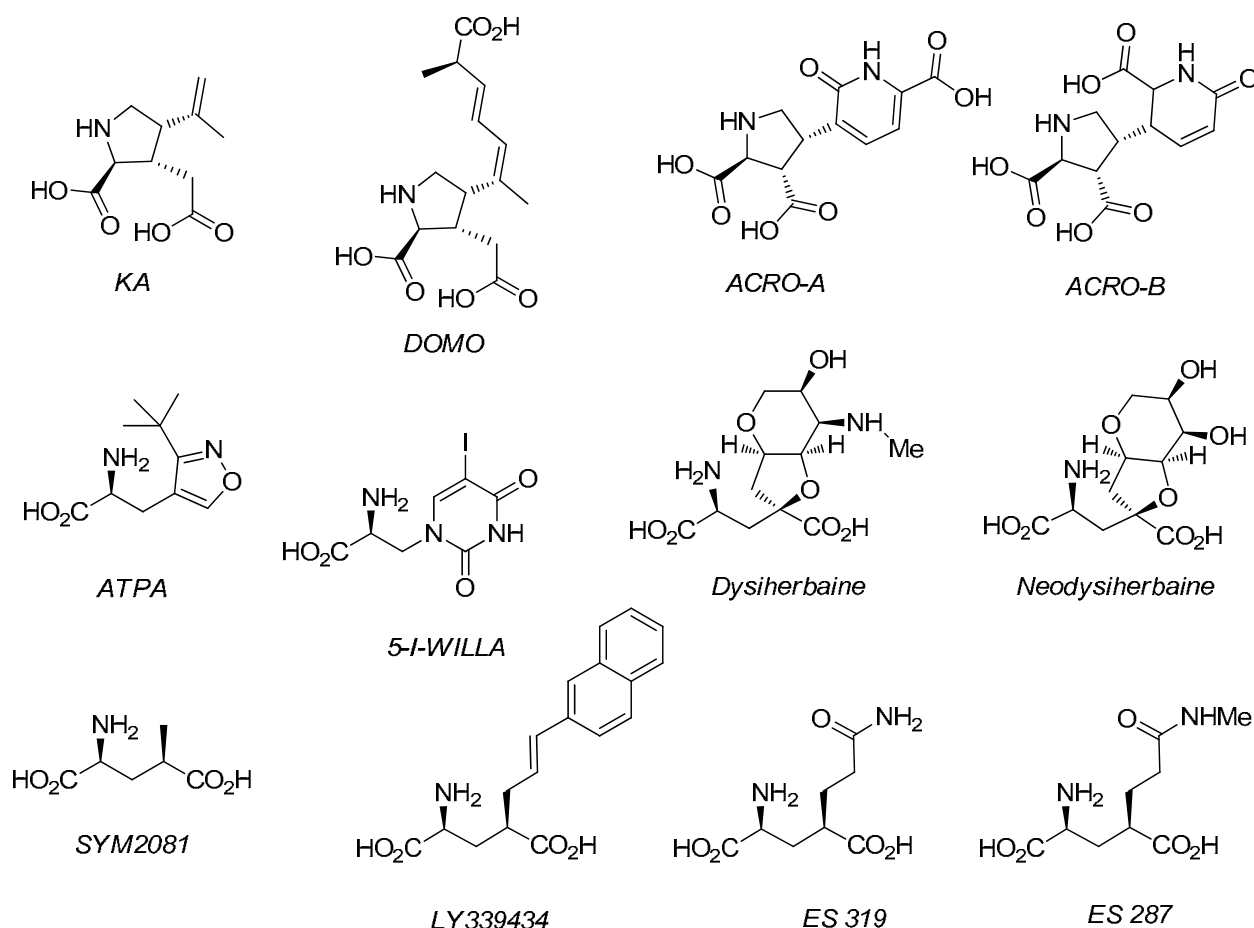


Figure 18 : exemples d'agonistes sélectifs des KARs

1.3.1.3.2 Antagonistes des KARs

Le manque d'antagonistes sélectifs des KARs a limité la recherche sur le rôle fonctionnel de ces récepteurs dans le système nerveux. En effet la plupart des antagonistes sélectifs des iGluRs non-NMDA bloquent indistinctement les AMPARs et les KARs. Parmi les composés présentés comme sélectifs pour les KARs on trouve le NS-102 qui a été décrit comme antagoniste des récepteurs homomériques GluK2 et GluK1, avec peu d'effet sur les AMPARs hétéromériques GluA2/GluA4. Le faible degré de sélectivité et de solubilité limitent cependant l'utilité du NS-102 comme outil pharmacologique.⁴⁶

Une avancée importante dans la découverte d'antagonistes sélectifs des sous-unités des KARs a été faite à travers le développement de dérivés du composé LY293558, un antagoniste compétitif des AMPARs et des KARs (**figure 13**). Plusieurs produits sont apparus comme des antagonistes sélectifs des KARs contenant la sous unité GluK1. Ainsi on peut noter les

⁴⁶ T. A. Verdoorn; T. H. Johansen *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* **1994**, 269, 43-49.

composés LY466195⁴⁷, LY377770⁴⁸ et LY382884⁴⁰ (**figure 19**). Ce dernier composé réduit les réponses nociceptives des neurones spinothalamique dans un modèle de douleur neuropathique. En outre, ce composé présente des propriétés anxiolytiques.⁴⁹ Les deux composées LY377770 et LY382884 bloquent l'activité épileptique dans l'hippocampe ainsi que les crises épileptiques induites par des stimulations électrique *in vivo*.⁵⁰

Le MSVIII-19 un analogue des dysiherbaines a été signalé comme un antagoniste compétitif des récepteurs homomériques GluK1. Cependant les expériences électrophysiologiques pour déterminer l'activité de MSVIII-19 sur les sous-unités des KARs ont été faites en l'absence de concanavaline A, une lectine qui inhibe la désensibilisation des KARs. Il est donc possible que le MSVIII-19 soit un agoniste induisant une désensibilisation comme le SYM2081.⁵¹

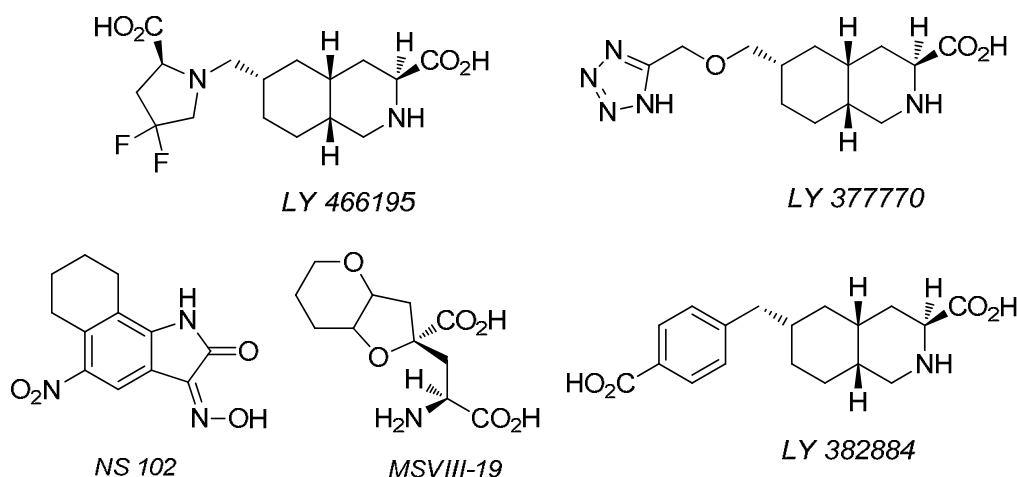


Figure 19 : exemples d'antagonistes sélectifs des KARs.

En dépit des progrès récents il reste encore beaucoup à apprendre et à comprendre sur la pharmacologie des sous-types des KARs et leurs propriétés fonctionnelles exprimées en homomères et hétéromères, dans les réseaux neuronaux.

1.3.2 Les récepteurs métabotropiques du Glu (mGluRs)^{52, 53}

Les mGluRs font partie de la classe III de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Ces GPCRs sont des récepteurs membranaires heptahéliques qui exercent

⁴⁷ B. Weiss, A. Alt, A. M. Ogden, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 318, 772-781.

⁴⁸ I. Smolders, Y. Michotte, *Nat. Neurosci.* **2002**, 796-804.

⁴⁹ A. Alt, B. Weiss, P. L. Ornstein, *Neuropharmacology* **2007**, 52, 1482-1487.

⁵⁰ I. Smolders, G. L. Collingridge, D. Lodge Y. Michotte *Nat. Neurosci.* **2002**, 5, 796-804.

⁵¹ J. M. Sanders, K. Ito, L. Settimo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 314, 1068-1078.

⁵² A. Palucha, A. Pilc *Pharmacol. Ther.* **2007**, 115, 116-147.

⁵³ K. R. Byrnes, D. J. Loane, A. I. Faden *Neurotherapeutics* **2009**, 6, 94-107.

leurs effets cellulaires en stimulant une étape clé du cycle d'activation des GTPases hétérotrimériques (ou protéines G). Les mGluRs sont classés en trois sous-groupes en fonction de leur homologie de séquence, du mécanisme de transduction du signal ainsi que de leur pharmacologie (**Tableau 2**).

mGluRs		
<i>Groupe I</i>	<i>Groupe II</i>	<i>Groupe III</i>
		mGluR4a-b
mGluR1a-d	mGluR2	mGluR6
mGluR5a-b	mGluR3	mGluR7a-b
		mGluR8a-b

Tableau 2 : les différents sous-groupes des mGluRs.

Le **groupe I** est composé des récepteurs mGluR1 et mGluR5 qui sont couplés à la phospholipase C (PLC) via des protéines de type $G_{\alpha q}$ et qui se situent principalement dans les régions post-synaptiques. Le **groupe II**, composé des 2 récepteurs mGluR2 et mGluR3 et le **groupe III** qui rassemble les sous-groupes mGluR4 et mGluR6-8 se caractérisent par un couplage avec l'adénylate cyclase via les protéines de type G_i/G_o , et sont essentiellement présynaptiques.

1.3.2.1 Structure des mGluRs

Les mGluRs sont des homodimères. Leur structure commune est constituée, d'un large domaine N-terminal extracellulaire, de sept domaines transmembranaires séparés par trois boucles intra- et extracellulaires, et d'un domaine C-terminal intracellulaire de longueur variable (plusieurs variants d'épissages) qui interagit avec la protéine G. Cette interaction implique aussi la troisième boucle intracellulaire. Le domaine N-terminal adopte une structure bilobée dénommée **Venus Fly-trap** qui contient le site de fixation du Glu et qui est liée à la région transmembranaire par un domaine riche en cystéines (**figure 20**). La fixation d'un agoniste sur la structure ouverte entraîne la fermeture de la structure bilobé qui produit l'activation du récepteur.

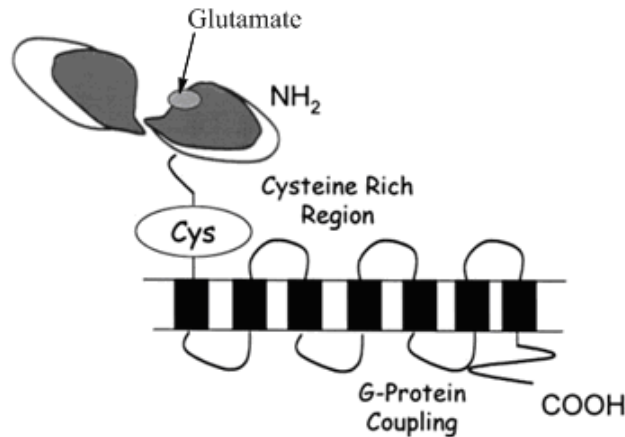


Figure 20: structure des mGluRs.⁵⁴

1.3.2.2 Fonctions des mGluRs

La fixation du Glu sur les mGluRs produit l'activation des protéines G. Cette activation agit positivement ou négativement sur des enzymes en interaction avec les protéines G couplées aux mGluRs des différents groupes.

Groupe I

La stimulation des mGluR1 et mGluR5 entraîne l'activation de la PLC. Cette dernière catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol-diphosphate membranaire en inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et diglycérade (DG). L'IP3 facilite la libération d'ions Ca^{2+} contenus dans des réserves intracellulaires. La libération des ions Ca^{2+} déclenche une série de réactions biochimiques et participe à la modulation de la plasticité synaptique. En particulier, une diminution de l'activité des canaux perméables aux ions K^{+} a pour effet une augmentation de l'excitabilité des neurones. De plus, les DGs activent la protéine Kinase C (PKC) qui catalyse la phosphorylation de résidus sérine induisant notamment la potentialisation des NMDARs et des AMPARs.

Groupes II et III

Les mGluRs des groupes II et III sont couplés à l'adénylate cyclase via des protéines G du type G_i/G_o . Leur stimulation inhibe l'activité de l'adénylate cyclase ce qui provoque la diminution de la concentration en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui provoque à son tour une diminution de la libération du Glu et donc de la transmission synaptique.

⁵⁴ R. Pellicciari, G. Costantino, A. Macchiarulo *Pharm. Acta Helv.* **2000**, 74, 231-237.

Contrairement aux mGluRs du groupe I, l'activation des mGluRs des groupes II et III entraînent une augmentation de la concentration intracellulaire des ions K^+ .

Les mGluRs sont exprimés dans une variété de types cellulaires au sein du SNC mais aussi au niveau périphérique. Ils ont été identifiés au niveau des neurones, des cellules gliales, des astrocytes, des oligodendrocytes mais aussi dans les lymphocytes T et B, les ostéoblastes, les hépatocytes ou encore les cellules endothéliales.

1.3.2.3 Ligands des mGluRs et potentialités thérapeutiques^{55, 13}

Des ligands agissant spécifiquement sur les mGluRs présentent un intérêt thérapeutique pour le traitement de la douleur, de l'anxiété, de la dépendance à certaines drogues et de nombreuses maladies et troubles du SNC comme l'épilepsie, la maladie de Parkinson ou la schizophrénie. Les mGluRs ayant un rôle modulateur, les drogues agissant sélectivement au niveau des mGluRs pourraient permettre de réguler finement le système Glutamatergique sans perturber lourdement la transmission synaptique. Comme dans le cas des iGluRs, les ligands sont divisés en plusieurs classes. Les agonistes et les antagonistes compétitifs (ligands orthostériques) se lient au domaine de fixation du Glu. Les antagonistes non compétitifs se fixent, quant à eux, au niveau du domaine transmembranaire (**figure 21**).

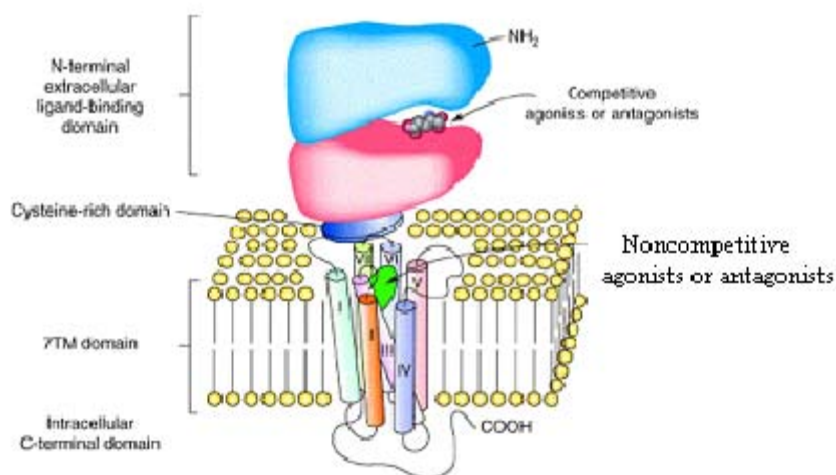


Figure 21 : structure des mGluRs⁵⁶

⁵⁵ F. Acher, *Tocris reviews* **2006**, 26, 1-12.

⁵⁶ Extrait de « La distribution subcellulaire des récepteurs du glutamate de type Kainate » de F. Jaskoski, disponible en ligne sur www.123bio.net.

1.3.2.3.1 Ligands des mGluRs du Groupe I

1.3.2.3.1.1 Agonistes

Le QUIS est l'agoniste le plus puissant des mGluRs du groupe I. Cependant son utilité est restreinte, car il active également les AMPARs. Le (*S*)-3,5-DHPG⁵⁷ est l'agoniste sélectif du groupe I le plus couramment utilisé mais il présente une activité modérée. On peut citer aussi les deux composés CHPG⁵⁸ et Z-CBQA⁵⁹ qui sont des agonistes du groupe I présentant une sélectivité pour le sous-type mGluR5 mais avec une affinité modérée (**figure 22**). A notre connaissance, aucun agoniste sélectif des mGluR1 n'a été décrit à ce jour.

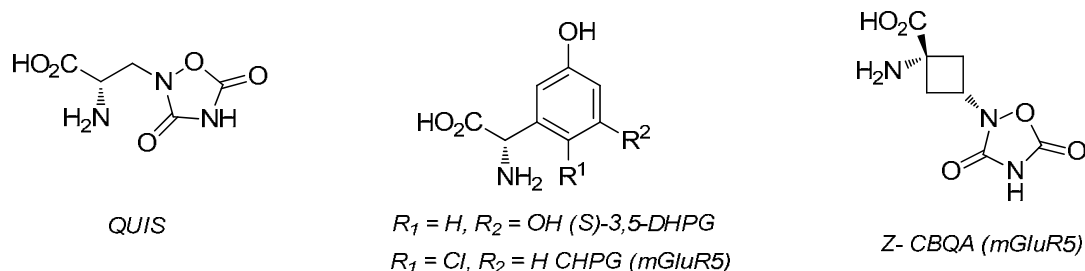


Figure 22 : agonistes des mGluRs du groupe I.

1.3.2.3.1.2 Antagonistes compétitifs

Ces molécules en se liant au site de fixation du Glu, entraînent une fermeture incomplète du domaine bilobé. Les antagonistes des mGluRs du groupe I possèdent des effets neuroprotecteurs, comme, par exemple, les composés AIDA⁶⁰, LY367385⁶¹, et 3-MATIDA⁶², qui sont des antagonistes sélectifs des récepteurs mGluR1, avec des affinités d'ordre micromolaire (**figure 23**).

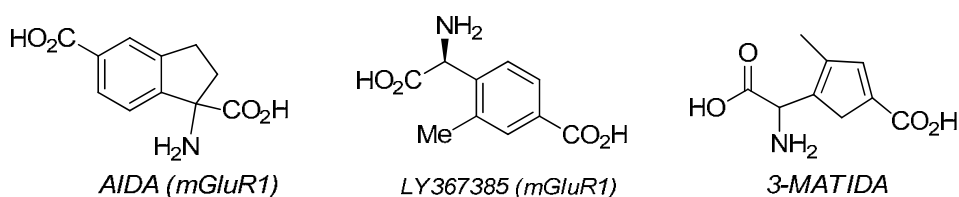


Figure 23 : antagonistes compétitifs des mGluRs du groupe I

⁵⁷ J. P. Pin, F. Acher *Curr. Drug Targets CNS & Neur. Dis.* **2002**, 1, 297-317.

⁵⁸ A. J. Doherty, M. J. Palmer, G. L. Collingridge, D. E. Jane *Neuropharmacology* **1997**, 36, 265-267.

⁵⁹ L. Littman, C. Tokar, S. Venkatraman, R. J. Roon, J. F. Koerner, M. B. Robinson, R. L. Johnson *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1639-1647.

⁶⁰ Moroni, D. E. Pellegrini-Giampietro; R. Luneia; R. Pellicciari *J. Pharmacol. Expl. Ther.* **1997**, 281, 721-729.

⁶¹ B. P. Clark, S. R. Baker, J. Goldsworthy, A. E. Kingston *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2777-2780.

⁶² F. Moroni, C. Noe; I. Sarichelou, D. E. Pellegrini-Giampietro *Neuropharmacology* **2002**, 42, 741-751.

Des effets de type anxiolytiques et antihyperalgiques ont aussi été décrits pour plusieurs antagonistes compétitifs des mGluR1.⁶³ A notre connaissance, aucun antagoniste compétitif sélectif des récepteurs mGluR5 n'a été décrit à ce jour.

1.3.2.3.1.3 Antagonistes non compétitifs et modulateurs allostériques négatifs

Le CPCCOEt a été le premier antagoniste non compétitif des mGluR1 décrit.^{64, 65} Depuis, de très nombreux composés ont été continuellement identifiés par screening, essentiellement au sein des compagnies pharmaceutiques. Ces molécules, présentent souvent des affinités d'ordre nanomolaire et un haut degré de sélectivité, ce qui leur confère des potentialités thérapeutiques à priori supérieures aux ligands orthostériques.

Les antagonistes non compétitifs des mGluR1 et mGluR5 présentent des potentialités thérapeutiques pour un grand nombre de troubles du SNC incluant l'anxiété et la dépression, les douleurs chroniques et neuropathiques, les problèmes d'addiction, la migraine...

A titre d'exemple, on peut citer les composés MPEP⁶⁶, MTEP⁶⁷ et le Fenobam⁶⁸ qui sont sélectifs des mGluR5 et pour lesquels ont été démontrés, entre autres effets, des propriétés anxiolytiques dans différents modèles animaux et humains (dans le cas du Fenobam).

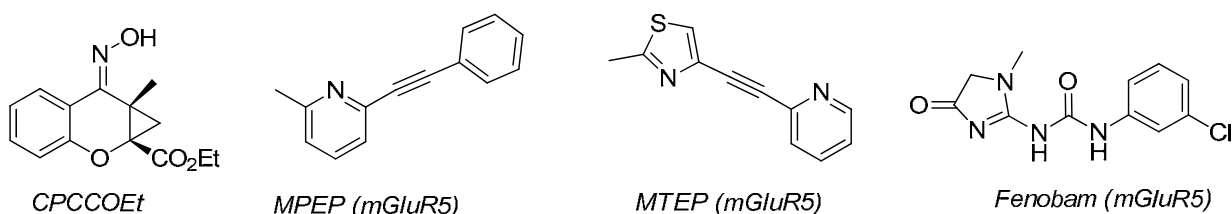


Figure 24 : antagonistes non compétitifs des mGluRs du groupe I.

Les antagonistes non compétitifs des mGluR5 présentent aussi une activité thérapeutique pour des troubles liés à la dépendance à certaines drogues. Ainsi par exemple l'inhibition des mGluR5 par le **MPEP** montre une diminution de l'auto-administration de la nicotine chez les rats et les souris.⁶⁹

⁶³ A. Klodzinska, G. Nowak *Drugs Future* **2002**, 27, 753-763.

⁶⁴ S. Litschig, L. Prézeau, J.-P. Pin; C. Thomsen, R. Kuhn *Mol. Pharmacol.* **1999**, 55, 453-461.

⁶⁵ H. Annoura, Y. Horikawa *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 763-766.

⁶⁶ F. Gasparini; K. Lingenhöhl; N. Stoehr; P. J. Flor; R. Kuhn *Neuropharmacology* **1999**, 38, 1493-1503.

⁶⁷ N. D. P. Cosford, X. Jiang, I. McDonald, M. Washburn, M. A. Varney *J. Med. Chem.* **2002**, 46, 204-206.

⁶⁸ R. H. P. Porter, J. Wichmann, E. Vieira, P. Malherbe *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 711-721.

⁶⁹ A. Markou *Biol. Psychiatry* **2007**, 61, 17-22.

1.3.2.3.1.4 Modulateurs allostériques positifs

Le développement de modulateurs allostériques positifs des mGluRs présente un grand intérêt car ces molécules permettent de moduler l'action des agonistes des mGluRs. Ils peuvent notamment améliorer la fixation des ligands compétitifs sur le site de fixation du Glu. Cependant ces molécules ne peuvent activer les récepteurs en l'absence d'un agoniste. Elles offrent donc une sélectivité d'action supérieure aux agonistes orthostériques et des potentialités de modulation plus fines de l'activation des récepteurs. Par ailleurs, les modulateurs allostériques permettent d'éviter les phénomènes de désensibilisation des récepteurs observés avec les agonistes.

Plusieurs séries de modulateurs positifs des mGluRs du groupe I ont été récemment décrites. Les modulateurs positifs sélectifs de mGluR5 présentent notamment des potentialités pour traiter les psychoses et les désordres cognitifs associés à la schizophrénie.⁷⁰

1.3.2.3.2 Ligands des mGluRs du groupe II

1.3.2.3.2.1 Agonistes

Les agonistes des mGluRs du groupe II présentent un fort potentiel thérapeutique et ont fait l'objet de nombreuses études. On peut citer en priorité le composé LY354740, qui présente une affinité d'ordre nanomolaire pour les mGluR2 et 3. En dépit de sa structure polaire chargée, ce composé franchit la barrière hématoencéphalique et il s'est avéré actif *in vivo* après administration par voie orale. Ce composé et sa prodrogue peptidique LY544344 ont fait l'objet de nombreuses études cliniques pour leurs propriétés anxiolytiques.⁷¹ De nombreux analogues basés sur la structure bicyclique du LY354740 ont été développés et ont fait preuve de diverses potentialités thérapeutiques. Parmi elles, on trouve le dérivé sulfone LY404039 (et sa prodrogue peptidique LY2140023 qui est actuellement à l'étude pour le traitement des troubles psychotiques associés à la schizophrénie.⁷² Ces structures contraintes dérivent de l'agoniste non sélectif L-CCG-I pour lequel la rigidification via l'introduction d'un second cycle a permis un gain d'affinité et de sélectivité. D'autres dérivés cyclopropaniques du L-CCG-I ont cependant été développés, comme par exemple le composé DCG-IV qui a manifesté des effets neuroprotecteurs prometteurs dans des modèles d'ischémie cérébrale.

⁷⁰ Y. Chen, P.J. Conn *Drugs Future* **2008**, 33, 355-360.

⁷¹ E. Dunayevich, J. Erickson, R. Landbloom, D. D. Schoepp *Neuropsychopharmacology* **2007**, 33, 1603-1610.

⁷² B. Wroblewska, D. A. Lewis *Am. J. Psychiatry* **2009**, 166, 753-756.

Le dipeptide endogène N-acétylaspartylglutamate (NAAG) a été longtemps décrit comme le seul agoniste sélectif des mGluR3. Cependants des travaux récemment publiés ont montrés que son activité vis-à-vis des mGluR3 était due à la présence d'une faible quantité du Glu dans des échantillons du NAAG.⁷³ Aucun agoniste sélectif des mGluR2 n'a encore été décrit. On peut citer cependant le composé X qui se conduit comme un agoniste des mGluR2 et un antagoniste des mGluR3.⁷⁴

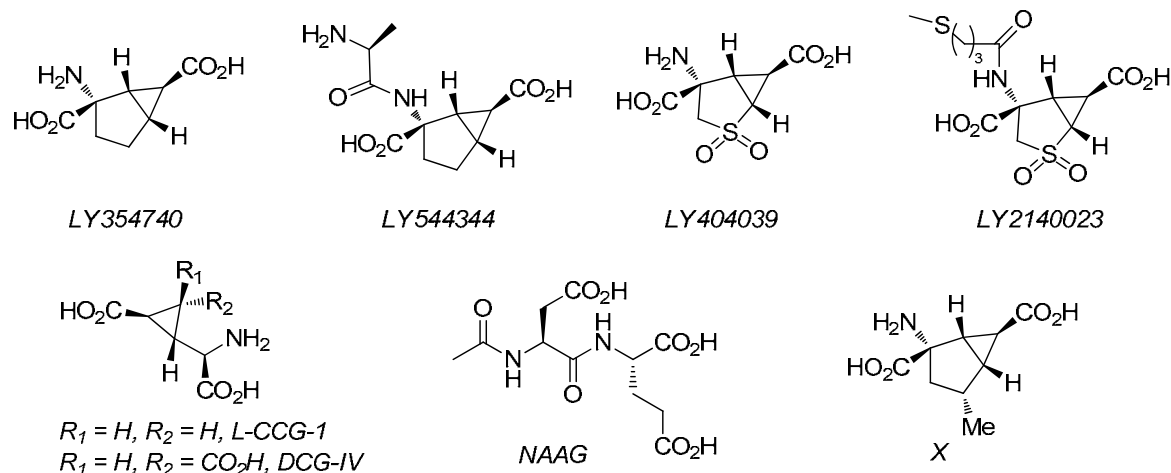


Figure 25 : agonistes des mGluRs du groupe II.

1.3.2.3.2.2 Antagonistes compétitifs

Parmi les nombreux analogues cyclopropaniques dérivés du L-CCG-I et les analogues bicycliques du LY354740, plusieurs molécules sont apparues comme des antagonistes compétitifs plus ou moins sélectifs du groupe II des mGluRs. Comme dans le cas des agonistes, ces molécules ne sont pas sélectives vis-à-vis des sous-types mGluR2 et mGluR3. On peut ainsi citer les dérivés LY341495, HYDIA et son dérivé MGS0039, ou encore l'analogue du Glu substitué en position 4 LY310225 (ADED). De façon un peu surprenante, certains de ces antagonistes manifestent, eux aussi, des effets anxiolytiques dans certaines modèles animaux. Des études avec les composés MGS0039 et LY341495 ont montré des potentialités pour le traitement des troubles obsessionnels compulsifs. De plus, ces mêmes molécules ont manifesté des effets antidépresseurs que ne possèdent pas les agonistes.⁵¹ Enfin, des travaux récents avec

⁷³ M. Chopra, Y. Yao, T. J. Blake, D. R. Hampson *JPET*, **2009**, 330, 212-215.

⁷⁴ C. Dominguez, L. Prieto, D. D. Schoepp, J. A. Monn *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3605-3612.

le composé LY341495 présentent l'inhibition des mGluRs du groupe 2 comme une stratégie possible pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.⁷⁵

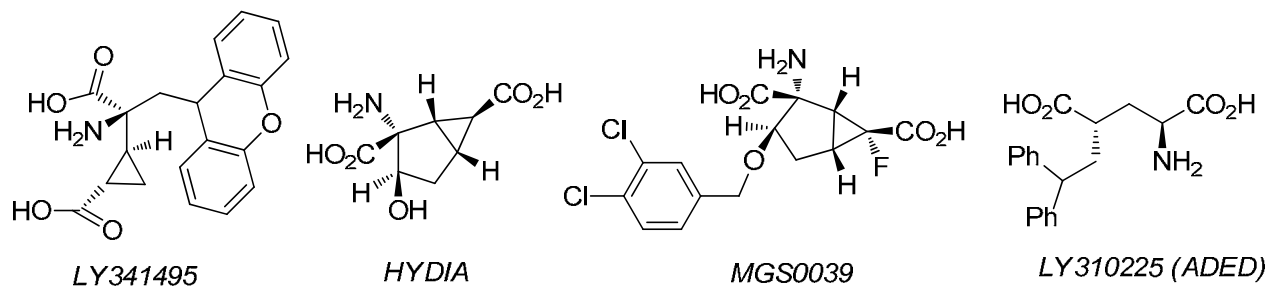
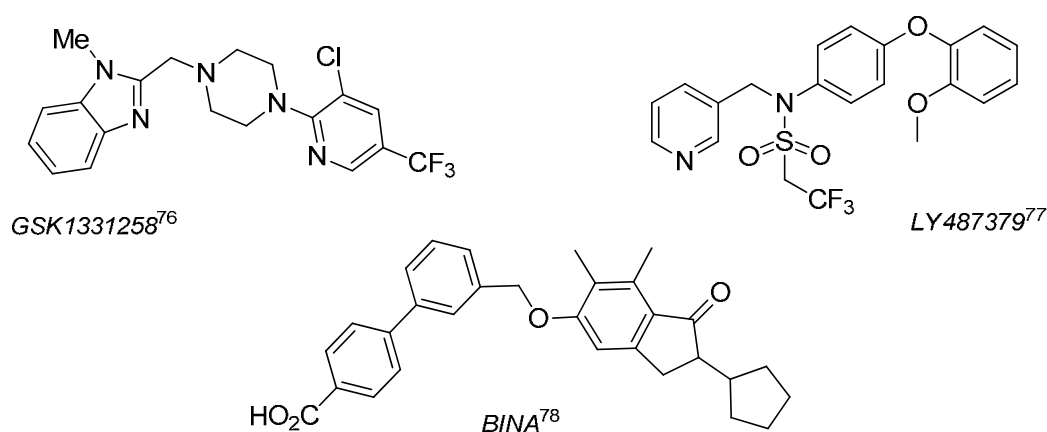


Figure 26 : antagonistes compétitifs des mGluRs du groupe II.

1.3.2.3.2.3 Modulateurs allostériques

A notre connaissance, peu d'antagonistes non compétitifs des mGluRs du groupe II ont été décrits à ce jour. En revanche, des données bien plus nombreuses font état de la préparation et des potentialités des modulateurs positifs des mGluR2 et 3. Comme dans le cas des agonistes, ces molécules présentent un grand intérêt pour le traitement des troubles liés à l'anxiété et à la schizophrénie. A la différence des agonistes, plusieurs modulateurs sont apparus sélectifs du sous-type mGluR2 qui semble être le récepteur impliqué dans les effets antipsychotiques observés avec les agonistes des mGluR2/3.

Compte tenu des avantages, présentés précédemment, de "l'approche allostérique" le développement de ces composés suscite actuellement de nombreux efforts au sein de l'industrie pharmaceutique. La figure 27 présente quelques exemples de modulateurs allostériques positifs.^{76, 77, 78}



⁷⁵ S. H. Kim, P. E. Fraser, P. H. St. George-Hyslop, M. E. Ehrlich, S. Gandy *J. Neurosci.* **2010**, 30, 3870.

⁷⁶ P. L. D'Alessandro, A. Sava, D. Montanari, S. P. Watson *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 759-762.

⁷⁷ H. Schaffhauser, B. A. Rowe, S. Morales, M. A. Varney, L. P. Daggett *Mol. Pharmacol.* **2003**, 64, 798-810.

⁷⁸ R. Galici, C. K. Jones, L. C. Williams, T. de Paulis, P. J. Conn *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 318, 173-185.

Figure 27 : exemple de modulateurs allostériques positifs des mGluRs du groupe II.

1.3.2.3.3 Ligands des mGluRs du groupe III

Le rôle spécifique des différents sous-types des mGluRs du groupe III est moins bien documenté. Le manque de ligands sélectifs au sein de ce groupe explique largement ce déficit d'information.

1.3.2.3.3.1 Agonistes

La plupart des agonistes décrits activent les 3 sous-types mGluR4,6,8 avec des affinités d'ordre micromolaire ou submicromolaire et présentent une affinité plus faible pour le sous-type mGluR7. Parmi ces agonistes, on trouve les composés L-AP4, L-SOP, APCPr, S-PPG ou ACPT-I. On peut noter que la plupart de ces composés présentent des groupements potentiellement dianioniques sur leurs chaînes latérales (phosphonate, phosphate ou dicarboxylate). On peut aussi citer le 3,4-DCPG qui a montré une sélectivité pour le récepteur mGluR8 ainsi qu'une série de dérivés de l'AP4 incluant les molécules LSP1-2111 et LSP1-3081 qui ont une affinité préférentiel vis-à-vis des mGluR4 (**figure 28**).^{79, 80, 81}

L'activation des mGluRs du groupe 3 et en particulier des mGluR4 présente un fort potentiel thérapeutique pour traiter les symptômes de la maladie de Parkinson.^{82, 77, 78} Des travaux récents ont aussi montré que l'ACPT-I présente une activité antihyperalgique dans des modèles animaux de douleurs chroniques inflammatoires ou neuropathiques.⁸³ Plusieurs agonistes du groupe III ont aussi montré des activités anxiolytiques dans plusieurs modèles animaux.^{50, 84}

⁷⁹ D. Cuomo, G. Martella, E. Barabino, F. Acher, A. Pisani, C. Beurrier, C. Melon, L. K.-L. Goff, P. Gubellini *J. Neurochem.* **2009**, *109*, 1096-1105.

⁸⁰ C. Beurrier, S. Lopez, D. Revy, F. Acher, J.-P. Pin, M. Amalric *FASEB J.* **2009**, *23*, 3619.

⁸¹ C. Selvam, N. Oueslati, I. A. Lemasson, C. Goudet, J.-P. Pin, F. C. Acher *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2797-2813.

⁸² S. Lopez, N. Turle-Lorenzo, F. Acher, E. De Leonibus, A. Mele, M. Amalric *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 6701-6711.

⁸³ C. Goudet, E. Chapuy, A. Alloui, F. Acher, J.-P. Pin, A. Eschalié *Pain* **2008**, *137*, 112-124.

⁸⁴ K. Stachowicz, A. Klodzinska, S. Schann, P. Neuville, A. Pilc *Neuropharmacology* **2009**, *57*, 227-234.

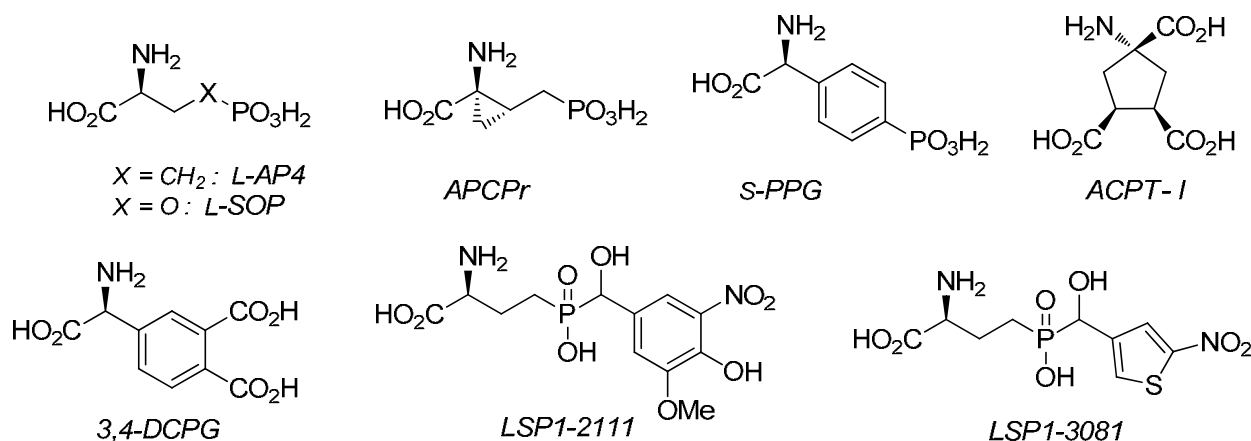


Figure 28 : agonistes des mGluRs du groupe III.

1.3.2.3.2 Antagonistes et modulateurs allostériques

Très peu d'antagonistes compétitifs efficaces et sélectifs des mGluRs du groupe III ont été décrits. On peut citer le MAP4 qui illustre l'effet de substitution de l'hydrogène α par un groupement méthyle permettant la conversion d'un agoniste en antagoniste. Le CPPG manifeste de même, une activité non sélective des différents sous-types des mGluRs du groupe III à des concentrations d'ordre micromolaire.

Récemment, des antagonistes allostériques sélectifs des mGluR7 ont été décrits.⁸⁵ Ces composés pourraient avoir des effets anxiolytiques et antidépresseurs.

Des données plus nombreuses sont disponibles concernant les potentialités des modulateurs positifs. Dans cette catégorie, plusieurs composés sélectifs des différents sous-types ont été identifiés. Par exemple, les molécules PHCCC et VU0155041 qui sont sélectifs des mGluR4 ont montré des activités prometteuses dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson (figure 29).^{86, 87}

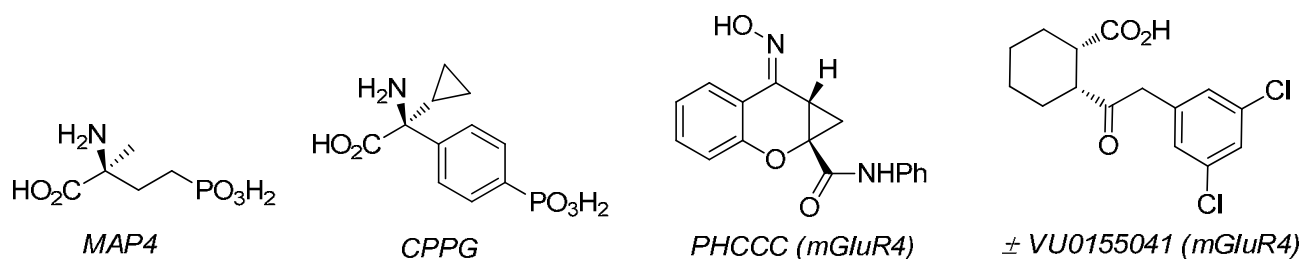


Figure 29 : antagonistes et modulateurs allostériques des mGluRs du groupe III.

⁸⁵ M. Nakamura, H. Kurihara, G. Suzuki, M. Ohkubo, H. Ohta *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 726-729.

⁸⁶ M. J. Marino, J. F. Hess, G. G. Kinney, P. J. Conn *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 13668-13673.

⁸⁷ C. M. Niswender, K. A. Johnson *Mol. Pharmacol.* **2008**, 74, 1345-1358.

1.4 Les transporteurs du Glu (GluTs)^{88, 89, 90, 91}

1.4.1 Généralités

Après sa libération à partir des vésicules présynaptiques et l'activation des différents types de GluRs, la recapture rapide du Glu met en jeu des transporteurs membranaires localisés sur les neurones aux niveaux présynaptique et postynaptique et / ou sur les cellules gliales avoisinantes. D'autres transporteurs spécifiques assurent l'internalisation du Glu dans les vésicules présynaptiques.

Les transporteurs membranaires sont Na⁺-dépendant et nommés EAATs chez l'Homme (Excitatory Amino Acids Transporters). Ce terme générique est lié au fait que ces transporteurs présentent la particularité de transporter les acides D- et L-aspartique avec une efficacité similaire à celle du Glu. L'importance physiologique du transport de l'Asp n'a cependant pas été démontrée. Les transporteurs qui interviennent au niveau des vésicules synaptiques sont notés VGluTs et ils sont H⁺-dépendants (Vesicular Glutamate Transporters). Les EAATs sont divisés en cinq sous-groupes (EAAT1-5) et les VGluTs en trois sous-types (VGluT1-3).

1.4.2 Structure et Fonction des EAATs

Les transporteurs EAAT1 (GLAST chez les rongeurs) et EAAT2 (GLT-1 chez les rongeurs) se situent essentiellement au niveau des cellules gliales et en particulier des astrocytes ou le sous-type EAAT2 assure 90% de la recapture du Glu. L'expression des EAAT1 et 2 est dépendante du stade de développement du SNC. Les transporteurs EAAT3 (EAAC1 chez les rongeurs) et EAAT4 sont quant-à-eux essentiellement neuronaux et localisés au niveau postsynaptique. Le sous-type EAAT5 est trouvé uniquement dans la rétine. Ces transporteurs sont responsables de la terminaison du signal de transduction et empêchent la neurotoxicité causée par une concentration trop élevée en Glu dans la fente synaptique.

Les EAATs sont des homotrimères. Chaque sous-unité est formée d'un domaine N et C terminal intracellulaires, de huit hélices transmembranaires (TM1-8) et de deux boucles hélicoïdales (HP1 et HP2) qui sont connectées via des boucles extra et intracellulaires. La partie N-terminale (TM1-6) de la protéine est arrangée comme un cylindre tordu formant la surface

⁸⁸ R. J. Bridges, C. S. Esslinger *Pharmacol. Ther.* **2005**, *107*, 271-285.

⁸⁹ A. L. Sheldon, M. B. Robinson *Neurochem. Int.* **2007**, *51*, 333-355.

⁹⁰ L. Bunch, M. N. Erichsen, A. A. Jensen *Exp. Opin. Ther. Targets* **2009**, *13*, 719-731.

⁹¹ G. E. Torres, S. G. Amara *Curr. Opin. Neurobiol.* **2007**, *17*, 304-312.

externe du transporteur. La partie C-terminale du transporteur (TM7 et 8, HP1 et HP2) est directement impliquée dans le transport du Glu (**Figure 30**).

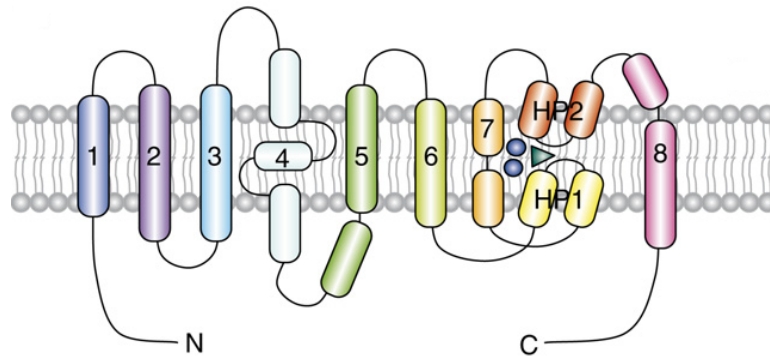


Figure 30 : structure commune aux sous-unités des EAATs.⁹

L'internalisation du Glu par les EAATs est thermodynamiquement très défavorable si l'on considère le gradient de concentration existant de part et d'autre de la membrane des neurones. Elle est rendue possible grâce au co-transport de cations Na^+ et K^+ à travers la membrane. Les apports d'énergie nécessaires sont fournis par des gradients de sodium et de potassium maintenus par les pompes Na, K-ATPase. Ainsi, le transport d'une molécule de Glu est couplé au co-transport de 3 ions Na^+ , d'un ion H^+ et à la sortie d'un cation K^+ (**figure 31**).

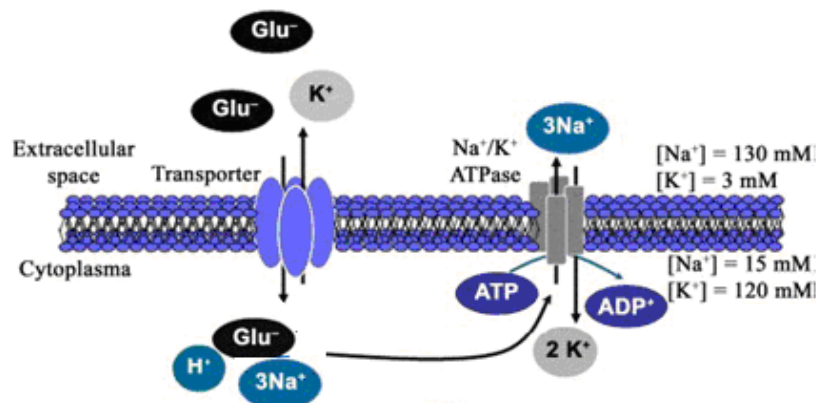


Figure 31 : schéma des transporteurs Na^+ dépendants.⁹²

La stœchiométrie indique l'entrée nette d'une charge positive, ce qui se traduit par la polarisation de la membrane. En plus de ces échanges d'ions, le Glu semble activer le transport d'ions chlorures en particulier à travers les EAAT4 et 5.

⁹² A. Camacho; L. Massieu *Arch. Med. Res.* **2006**, 37, 11-18.

1.4.3 Structure et fonction des VGLUTs⁹³

Les VGLUTs sont spécifiques du Glu (l'Asp n'est pas un substrat) mais ils présentent une affinité pour le Glu plus faible que les EAATs ($K_m \approx 1\text{mM}$; 4-40 μM pour les EAATs).

Les VGLUTs sont enchâssés dans la membrane des vésicules synaptiques par dix domaines transmembranaires comme le montre la figure 45. Les 3 sous-types de transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1, 2 et 3), ont des séquences très conservées (plus de 70 % d'homologie). Les VGLUT 1 et 2 sont exprimés de façon variable et complémentaire dans les différentes régions du cerveau ou ils sont parfois coexprimés au sein de certaines neurones et mêmes dans certains vésicules. Le sous-type VGLUT3 est exprimé de façon moins importante dans diverses parties du cerveau mais dans des populations particulières de neurones, notamment des neurones GABAergique, cholinergiques ou sérotoninergiques.

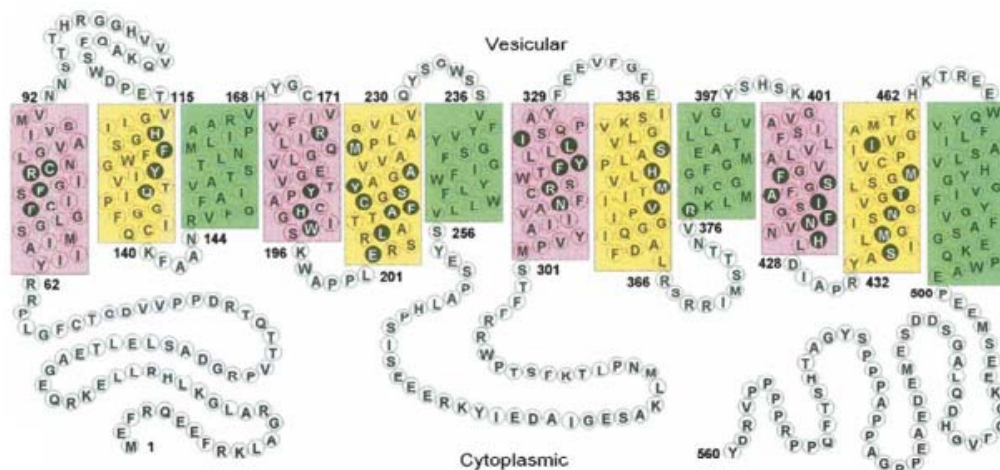


Figure 32 : Transporteur vésiculaire VGLUT.⁹⁴

Le remplissage des VGLUTs par le glutamate dépend d'un gradient de proton créé par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate par une H^+ ATPase vésiculaire. En outre, le transport vésiculaire optimal nécessite une faible concentration d'ions chlorures (**figure 33**).

⁹³ M. L. Lecznar, J. S. Kramska, *Acta Neurobiol. Exp.* **2007**, 67, 207-218.

⁹⁴ J. Almqvist, Y. Huang, A. Laaksonen, *Prot.Sci.* **2007**, 16, 1819-1829.

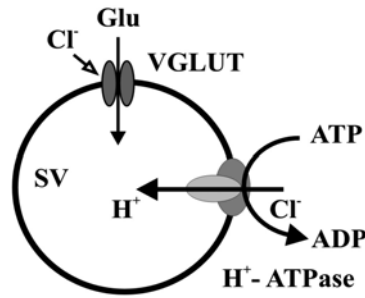


Figure 33 : Mécanisme du transport du Glu par les VGLUTs.⁹²

L'accumulation du Glu dans les vésicules synaptiques assure le caractère quantique de la neurotransmission et participe aussi au contrôle du gradient de concentration du Glu à travers la membrane plasmique.

1.4.4 Autres transporteurs du Glu

En plus des EAATs et des VGLUTs, il existe d'autres transporteurs comme le système X_c⁻ cystine / glutamate antiporteur. Celui-ci participe aussi au maintien des niveaux intra et extracellulaire du Glu. Ce système échange la cystine extracellulaire par le Glu intracellulaire. Cet échange fournit notamment une source de cystéine pour la synthèse de la glutathione.

Globalement, les rôles spécifiques des différents sous-types de transporteurs sont encore très mal connus en raison notamment du manque de ligands sélectifs.

1.4.5 Pharmacologie des EAATs

Il peut exister deux types d'inhibiteurs des GluTs: les **inhibiteurs substrats** des GluTs qui entrent en compétition avec le Glu et qui peuvent être transportés et les **inhibiteurs non substrats** des GluTs qui bloquent les transporteurs sans être internalisés.

Compte tenu des phénomènes d'excitotoxicité impliqués dans divers troubles et maladies du SNC, l'activation des EAATs semble à priori la meilleure option pour engendrer des effets thérapeutiques. Cependant l'inhibition des EAATs présente aussi des applications thérapeutiques potentielles. En effet, il peut être primordial de bloquer ces GluTs dans certaines conditions comme dans les cas d'ischémie ou d'hypoxie : les déficits en oxygène et en énergie perturbent fortement les gradients ioniques entretenus par les pompes Na⁺/K⁺-ATP dépendantes. Le flux du Glu à travers les EAATs peut alors être inversé renforçant le phénomène d'excitotoxicité pouvant conduire à la mort neuronale.

1.4.5.1 Inhibiteurs des EAATs

A la recherche d'inhibiteurs actifs et sélectifs plusieurs groupes ont évalué des analogues du Glu ou de l'Asp. Parmi les analogues de l'Asp, des dérivés du β -thréo-hydroxyaspartate sont connus pour avoir des activités inhibitrices vis-à-vis des EAATs (**figure 34**). Le TBOA présente une activité inhibitrice à des concentrations d'ordre micromolaire. Cependant, cette molécule n'est pas sélective des différents sous-types et montre également une activité vis-à-vis des récepteurs NMDA. De nombreux dérivés ont été préparés dans cette série parmi lesquels le TFB-TBOA. Ce composé a manifesté une affinité accrue ($IC_{50} = 22, 17$ et 300 nM respectivement vis-à-vis des EAAT1-3). De plus le TFB-TBOA peut être considéré comme inactif vis-à-vis des GluRs.⁹⁵ On peut citer aussi l'analogue "désoxygéné" L- β -BA qui a montré une affinité marquée pour EAAT3 ($IC_{50} = 8,7, 10$ et $0,8$ μ M respectivement vis-à-vis des EAAT1-3). Ce composé constitue un point de départ intéressant pour le développement d'inhibiteurs sélectifs des EAAT3.⁹⁶ Enfin dans la série des analogues de l'Asp, on peut citer le composé WAY 213613 pour lequel l'acide en β est converti en amide.⁹⁷ Ce composé présente une activité marquée et une sélectivité pour le sous-type EAAT2 ($IC_{50} = 5, 0,085$ et $3,8$ μ M) (**figure 34**).

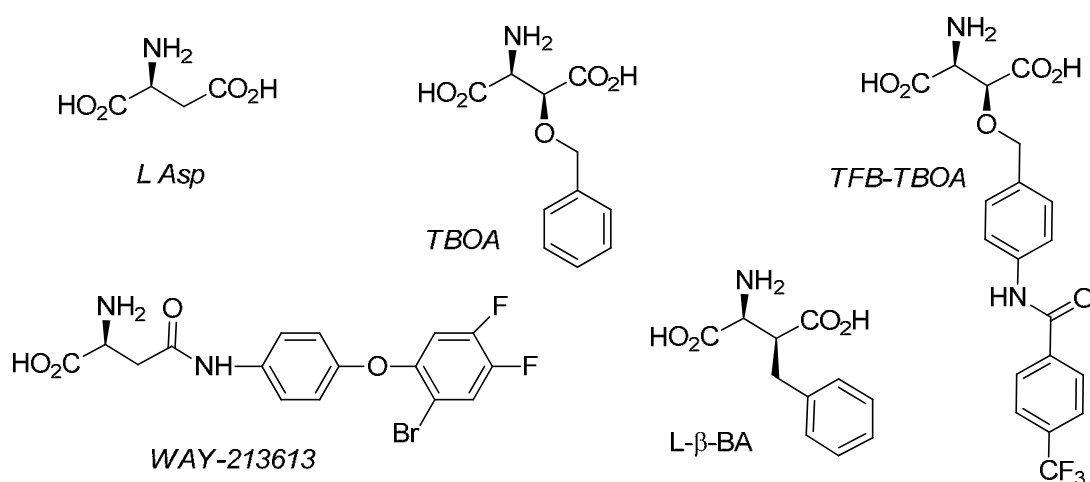


Figure 34 : analogues de l'Asp inhibiteurs non substrats des EAATs.

L'introduction de substituants sur le squelette du Glu a aussi permis de révéler des activités inhibitrices sélectives (**figure 35**). Ainsi, le (2*S*,4*R*)-4-méthylglutamate (SYM2081) s'avère être un inhibiteur non substrat des EAAT2-3 et un substrat des EAAT1 avec des

⁹⁵ K. Shimamoto, R. Sakai, T. Nakajima, S. G. Amara, Y. Shigeri *Mol. Pharmacol.* **2004**, 65, 1008-1015.

⁹⁶ C. S. Esslinger, S. Agarwal, M. P. Kavanaugh, R. J. Bridges *Neuropharmacology* **2005**, 49, 850-861.

⁹⁷ J. Dunlop, H. B. McIlvain, J. Williams, A. Foster, J. Butera *Mol. Pharmacol.* **2005**, 68, 974-982.

affinités d'ordre micromolaire. Son radiomarquage a permis de caractériser sa fixation et son transport au niveau des EAAT1 et 2 cependant, comme nous l'avons évoqué précédemment ce composé est aussi un agoniste des KARs. Le *rac-thréo* -3 méthyl-Glu (T3MG) montre une sélectivité vis-à-vis des EAAT2. Il semble par ailleurs être un substrat ayant peu d'affinité pour EAAT4.⁹⁸ Une série d'analogues alkylés de configuration L-(2,4)-*syn* synthétisés au laboratoire a été étudiée vis-à-vis des EAAT1-3.⁹⁹ Toutes ces molécules sont des inhibiteurs non substrats des EAATs ne présentant pas de sélectivité marquée. Cependant l'introduction d'un groupe volumineux hydrophobe (2-(N-2,2-diphényléthyl)aminocarboxyléthyl) dans le cas du composé DPAG a montré une activité inhibitrice sélective pour EAAT2.¹⁰⁰ L'affinité demeure modeste (75 μ M) cependant cette molécule est apparue inactive vis-à-vis des GluRs ce qui est en fait un point de départ intéressant pour développer des molécules plus efficaces.

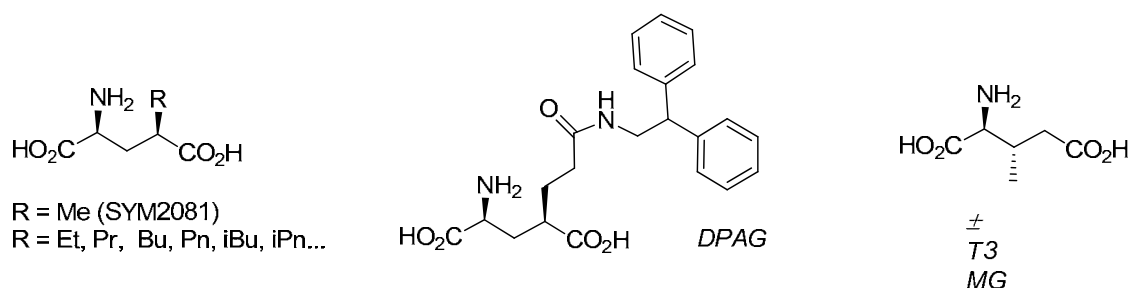


Figure 35 : analogues de Glu substitués par des groupements alkyles.

De nombreux analogues contraints du Glu ont aussi été étudiés afin de préciser la conformation privilégiée du Glu lors de sa liaison aux EAATs. La série des L-2-(carboxycyclopropyl) glycines (L-CCG I-IV) a ainsi été testée vis-à-vis des EAATs (**figure 36**). Parmi ces composés, le dérivé L-CCG III a montré l'activité inhibitrice la plus marquée: cette molécule se comporte comme un substrat des EAAT1 et 2 (K_i respectifs = 7,5 et 2,5 μ M). Cependant le L-CCG III montre une affinité comparable pour les KARs et n'est donc pas un inhibiteur sélectif des EAATs.¹⁰⁹

⁹⁸ S. Eliasof, H. B. Mcilvain, R. E. Petroski, J. Dunlop *J. Neurochem.* **2001**, 77, 550-557.

⁹⁹ S. Alaux, M. Kusk, E. Sagot, J. Bolte, A. A. Jensen, H. Bräuner-Osborne, T. Gefflaut, L. Bunch *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 7980-7992.

¹⁰⁰ E. Sagot, A. A. Jensen, D. S. Pickering, X. Pu, M. Umberti, T. B. Stensbol, B. Nielsen, Z. Assaf, B. Aboab, J. Bolte, T. Gefflaut, L. Bunch *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4085-4092.

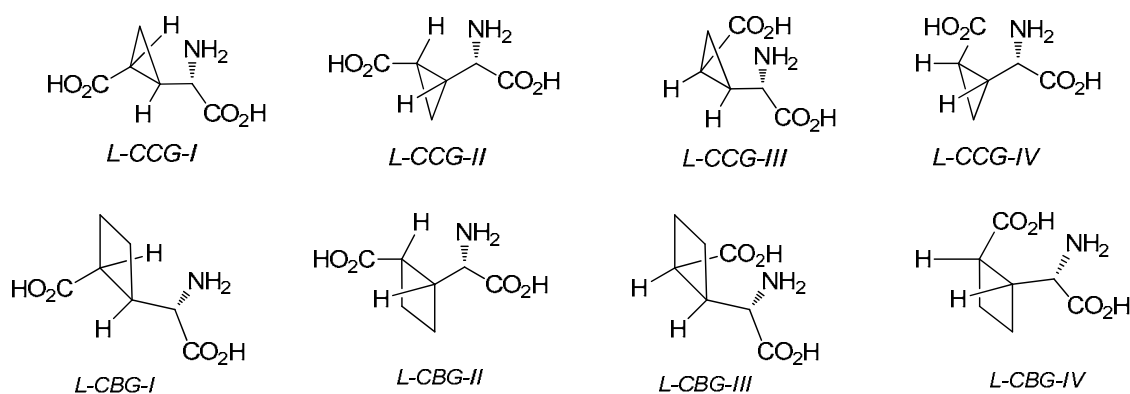


Figure 36 : séries des L-CCG et L-CBG.

Une autre série de 2-(carboxycyclobutyl)glycines (L-CBG I-IV) a été synthétisée au laboratoire et testée vis-à-vis des EAATs.¹⁰¹ Parmi ces composés, seul le L-CBG IV présente une sélectivité d'inhibition vis-à-vis des EAAT 2 et 3 (K_i respectif = 7 et 10 μ M).

Parmi les autres molécules cycliques qui ont montré une activité inhibitrice des EAATs, on trouve le DHK¹⁰², le BOAD¹⁰³, le HIP-A¹⁰⁴ ou le WAY-855¹⁰⁵ (**figure 37**). Tous ces dérivés sont actifs à des concentrations d'ordre micromolaire avec peu de sélectivité à l'exception du DHK sélectif du sous-type EAAT2 mais qui est aussi un agoniste des récepteurs non NMDA. Le composé HIP-A a montré des effets neuroprotecteurs vraisemblablement liés à l'inhibition préférentielle de l'efflux du Glu à travers les EAATs limitant l'augmentation de la concentration du Glu extracellulaire.¹⁰² Les résultats obtenus avec les dérivés cycliques indiquent une liaison privilégiée du Glu dans sa conformation repliée dite "Folded conformation".

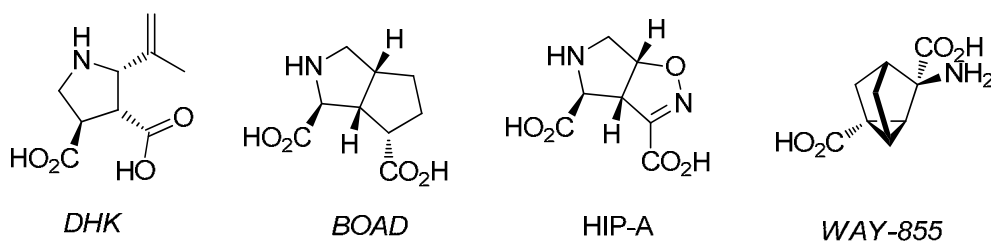


Figure 37 : exemples d'inhibiteurs cycliques des EAATs.

Récemment, un criblage de chimiothèque a donné lieu à la préparation d'une série de molécules parmi lesquelles **UCPH-101** a été signalé comme le premier inhibiteur efficace et

¹⁰¹ S. Faure, A. A. Jensen, V. Maurat, X. Gu, E. Sagot, D. J. Aitken, J. Bolte, T. Gefflaut, L. Bunch, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6532-6538.

¹⁰² R. J. Vandenberg, V. J. Balcar, G. A. R. Johnston *Mol. Pharmacol.* **1997**, 51, 809-815.

¹⁰³ L. Bunch, B. Nielsen, A. A. Jensen, H. Bräuner-Osborne *J. Med. Chem.* **2005**, 49, 172-178.

¹⁰⁴ S. Colleoni, M. Gobbi *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, 326, 646-656.

¹⁰⁵ J. Dunlop, T. Carrick *Br J. Pharmacol.* **2003**, 140, 839-846.

sélectifs des EAAT1. Ce composé présente une bonne activité inhibitrice ($K_i = 0,66 \mu\text{M}$) ainsi qu'une sélectivité remarquable pour EAAT1 (facteur 400 par rapport à EAAT2 et 3) (**figure 38**).¹⁰⁶

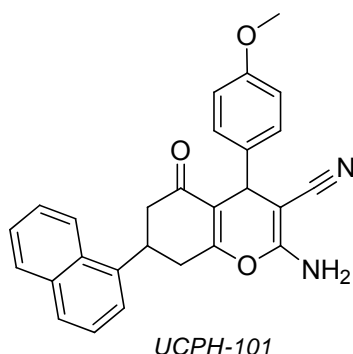


Figure 38 : structure d'un inhibiteur sélectif des EAAT1.

1.4.5.2 Activateurs des EAATs

Comme nous l'avons déjà écrit, l'activation des EAATs apparaît comme une stratégie thérapeutique pour de nombreux troubles du SNC mettant en jeu le phénomène d'excitotoxicité.

Plusieurs molécules ont été décrites et étudiées pour leurs activités indirectes aux niveaux transcriptionnel, translationnel ou post-translationnel. Cependant, quelques molécules interagissent directement avec les transporteurs. Parmi elles, le Riluzole apparaît comme un modulateur allostérique positif, augmentant l'affinité des différents sous-types de transporteurs EAAT1-3 pour le Glu.¹⁰⁷ Ce composé a été approuvé pour le traitement de la sclérose latérale amyotrophique. De même, la Parawixine 1, une molécule extraite d'un venin d'araignée dont la structure n'est pas encore connue active les EAATs en augmentant leur efficacité de transport (turnover). Il semblerait que cette molécule possède la propriété prometteuse d'activer sélectivement l'influx de Glu (**figure 39**).¹⁰⁸

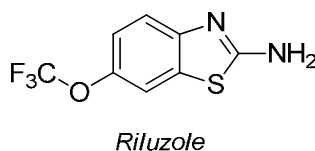


Figure 39 : structure du Riluzole.

¹⁰⁶ A. A. Jensen, M. N. Erichsen, C. W. Nielsen, T. B. Stensbøl, J. Kehler, L. Bunch *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 912-915.

¹⁰⁷ E. Fumagalli, M. Funicello, M. Gobbi, T. Mennini *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, 578-171-176.

¹⁰⁸ A. C. K. Fontana, N. C. Danbolt, S. G. Amara *Mol. Pharmacol.* **2007**, 72, 1228-1237.

1.4.6 Pharmacologie des VGluTs¹⁰⁹

L'activité des transporteurs vésiculaires influence directement la quantité du Glu libéré dans la synapse et la recherche d'inhibiteurs sélectifs des VGluTs, bien qu'encore peu développée, suscite un intérêt grandissant pour mieux cerner le rôle spécifique des différents sous-types et les potentialités thérapeutiques de ces composés.

Plusieurs séries d'analogues du Glu ont été étudiées. Parmi les composés ayant manifesté un effet inhibiteur notable, on peut citer de nouveau le (2*S*,4*R*)-4-Methyl Glu et le L-trans-ACPD qui présentent des constantes d'inhibition d'ordre millimolaire (0,7 et 0,2 mM respectivement). Le L-trans-ACPD s'est avéré être un substrat des VGluTs.¹¹⁰

Des dérivés des acides Kynuréniques et xanthuréniques ont aussi montré une activité inhibitrice comparable.¹¹¹ Des analogues dicarboxylés ont aussi été préparés parmi lesquels on peut citer par exemple le 6-phényl-4-yl-quinoline-2,4-dicarboxylate (BPQDC) qui présente une affinité d'ordre micromolaire ($K_i = 41 \mu\text{M}$). Cependant l'activité de ces molécules vis-à-vis des autres acteurs du système Glutamatergique n'a pas été rapportée (**figure 40**).

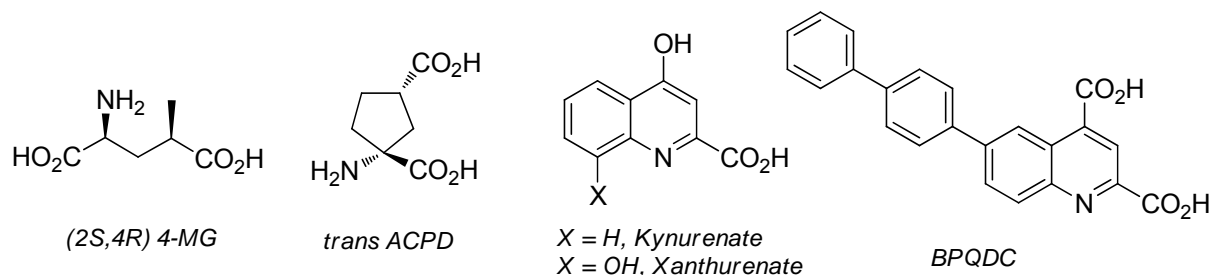


Figure 40 : principaux inhibiteurs des VgluTs

Enfin, il faut aussi mentionner l'effet inhibiteur marqué de plusieurs colorants dont le bleu d'Evans et le rose bengale, un dérivé polyhalogéné de la fluorescéine. Le premier inhibe les VGluT1 et 2 à des concentrations submicromolaires ($K_i \approx 300 \text{ nM}$)¹¹², Tandis que le second est apparu comme un inhibiteur non compétitif présentant un K_i d'environ 20 nM.¹¹³ La

¹⁰⁹ Y. Shigeri, R. P. Seal, K. Shimamoto *Brain. Res. Rev.* **2004**, 45, 250-265.

¹¹⁰ H. Winter, T. Ueda *Neurochem. Res.* **2008**, 33, 223-231.

¹¹¹ R. D. Bartlett, C. S. Esslinger, C. M. Thompson, R. J. Bridges *Neuropharmacology* **1998**, 37, 839-846.

¹¹² E. Herzog, B. Gasnier, B. Giros, S. El Mestikawy *J. Neurosci.* **2001**, 21, 181RC.

¹¹³ K. Ogita; K. Hirata, Y. Tamura; A. M. Leckenby, T. Ueda *J. Neurochem.* **2001**, 77, 34-42.

pharmacodulation de ces structures n'a, pour l'instant, pas permis d'augmenter l'efficacité de ce type d'inhibiteurs (**Figure 41**).¹¹⁴¹¹⁵

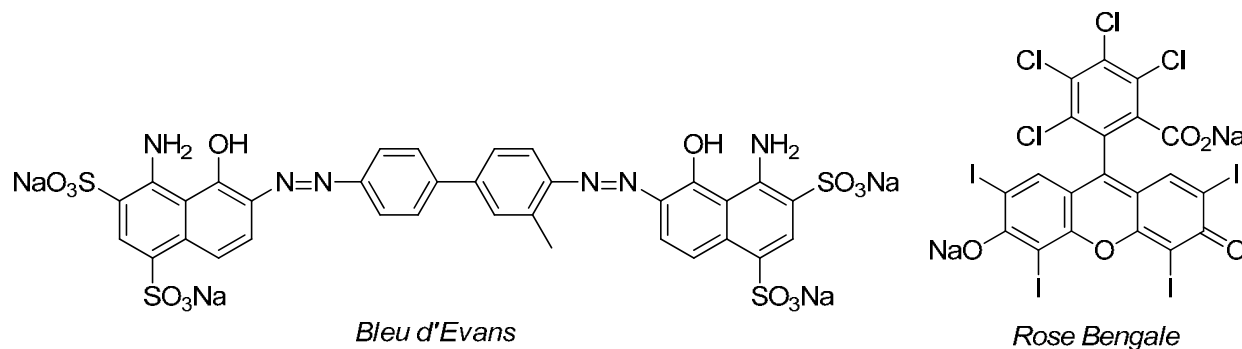


Figure 41 : structure du rose bengale et du bleu d'Evans

Les inhibiteurs de VGluTs sont donc encore peu nombreux et pas ou peu sélectifs. Les efforts de recherche doivent être poursuivis pour mieux cerner le rôle des différents sous-types de VGluT et leur implication dans divers troubles du SNC.

Aujourd'hui, la modulation sélective des récepteurs du Glu par des molécules de structures diverses et variées, semble être la stratégie thérapeutique la plus étudiée car elle permet de prévoir un minimum d'effets secondaires. Ainsi la recherche pharmaceutique s'oriente de plus en plus vers des ligands non compétitifs identifiés par criblage et qui présentent une sélectivité d'action et une biodisponibilité à priori supérieures à celles des ligands orthostériques compétitifs du Glu.

Cependant, l'élaboration de nouveaux analogues du Glu suscitent toujours l'intérêt des chercheurs pour améliorer la compréhension du SNC qui reste aujourd'hui une partie mystérieuse du corps humain : comme nous l'avons évoqué à plusieurs reprises, le rôle de certains types de transporteurs ou de récepteurs ainsi que leur implication dans le SNC restent encore à élucider.

¹¹⁴ D. G. Bole, T. Ueda *Neurochem. Res.* **2005**, 30, 363-369.

¹¹⁵ N. Pietrancosta; A. Kessler; T. Quentin; F. C. Acher *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 6922- 6933.

Chapitre 2 Principales méthodes de synthèse d'analogues du Glu

Ce chapitre a pour but de donner un aperçu des principales méthodes de synthèse permettant la préparation stéréosélective d'analogues du Glu substitués en position 3 et/ou 4. Quatre voies principales de synthèse s'en dégagent (**schéma 2**).

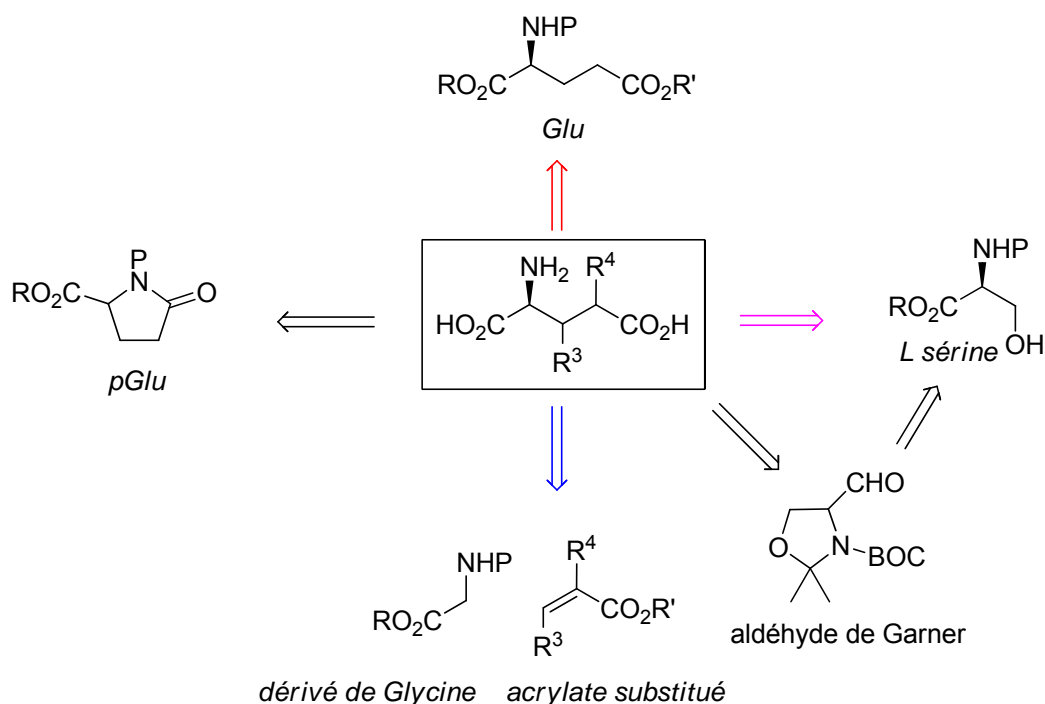


Schéma 2 : rétrosynthèse de l'analogue de Glu substitué en 3 et 4.

La substitution directe du L-Glu convenablement protégé ou de son analogue cyclique, l'acide pyroglutamique (pGlu) est une méthode importante qui, dans la plupart des cas, montre une bonne diastéréosélectivité et a permis de préparer de nombreux analogues du Glu. La création des liaisons C²-C³ ou C³-C⁴ à partir de dérivés de la Glycine ou de la Sérine a aussi fait l'objet de nombreux travaux.

2.1 Synthèses à partir du L-Glu

En 1989, Moloney et coll.¹¹⁶ ont décrit des réactions d'aldolisation mettant en jeu l'acide glutamique protégé par des groupements encombrants: esters tertibutyliques et groupement trityle sur la fonction amine. L'utilisation de l'isopropylcyclohexylamidure de lithium (LICA) et de plusieurs aldéhydes a permis de préparer plusieurs analogues protégés

¹¹⁶ J. E. Baldwin, M. North, A. Flinn, M. G. Moloney, *Tetrahedron* **1989**, 45, 1453-1464.

substitués en 4 par des groupements hydroxyalkyles. Cependant la diastéoselectivité de cette réaction est faible et conduit à des mélanges d'isomères.

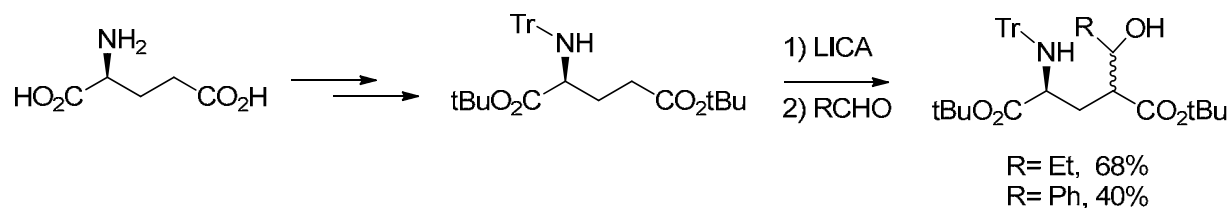


Schéma 3 : synthèse d'analogues du Glu par aldolisation à partir du L-Glu.

Plusieurs exemples d'alkylation sur la position 4 du Glu ont aussi été décrits. Si la protection des deux groupements carboxylates et de l'amine est judicieuse, alors l'alkylation, en plus d'être régiosélective, est aussi stéréosélective (**tableau 3**).

P	R ¹	R ²	Base	électrophiles	Rendements (%)	Stéréosélectivité <i>syn/anti</i>	Ref
Pf	tBu	Me	KHMDS	MeI	95	1/2	Koskinen et al. ¹¹⁷
Pf	tBu	Me	KHMDS	PrOTf	81	1/3	
Pf	tBu	Me	LTMP	BrCH ₂ CN	64	1/1,5	
NBz	Et Me	Et Me	LHMDS	Halogénures d'alkyles et allyliques	49-65	0/100	Gu et al. ¹¹⁸
Z BOC	Me	Me	LHMDS	BnBr	77 75	1/99	Hanessian et al. ¹¹⁹

Pf : 9-phénylfluorényle ; NBz : nitrobenzoyl ; Z : benzyloxycarbonyl ; BOC : tert-butyloxycarbonyl ; Bn : benzyle ; KHMDS : hexaméthylidisilazane de potassium ; LHMDS : hexaméthylidisilazane de lithium LTMP : Tetraméthylpipéridide de lithium

Tableau 3 : alkylation du Glu protégé.

¹¹⁷ A. M. P. Koskinen, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 1859.

¹¹⁸ Z.-Q. Gu, D. P. Hesson, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 2101-2104.

¹¹⁹ S. Hanessian, R. Margarita, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5887-5890.

Pour éviter une épimérisation du C² en présence d'une base forte, l'amine a été préférentiellement protégée par des groupements tels que, le 9-phénylfluorényle (Pf), le *p*-nitrobenzoyle (NBz), le Z, le BOC qui augmentent l'acidité du NH et évitent ainsi la déprotonation du C². Le choix de la base apparaît aussi important pour assurer la stéréosélectivité de l'alkylation. Les bases conjuguées de l'héxaméthylidisilazane KHMDS ou LHMDS, ont été privilégiées. Divers électrophiles ont été utilisés, en particulier des électrophiles activés, allyliques ou benzyliques. Dans tous les cas, une stéréosélectivité en faveur du dérivé *anti* a été observée.

L'obtention directe d'analogues du Glu substitués en position 4 par des hétéroatomes a aussi été décrite. Krasnov et al.^{120, 121} ont synthétisé le 4-bromo-Glu directement à partir du Glu protégé uniquement sur la fonction amine par un groupement Pf en présence de Br₂/PBr₅ sous irradiation (**schéma 4**). Des dérivés hydroxylés ou aminés ont ensuite été préparés par substitution nucléophile.

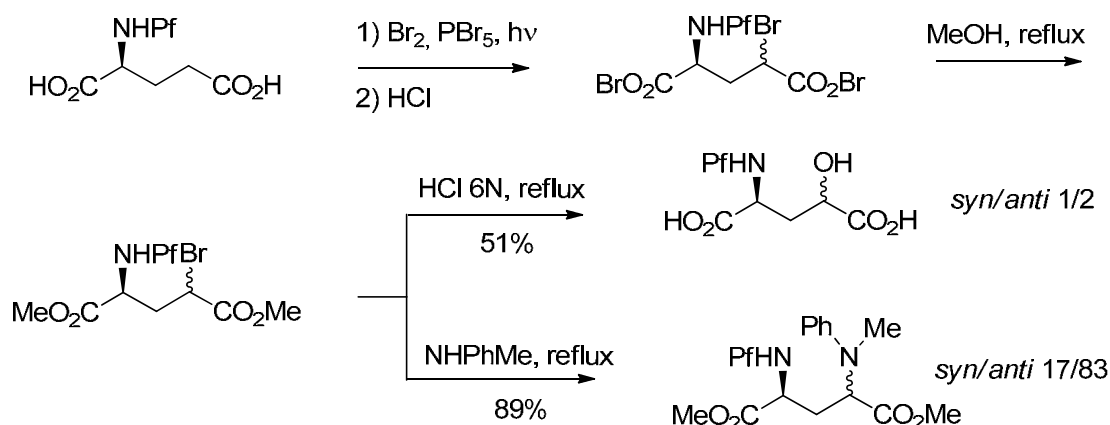


Schéma 4 : synthèse des 4- hydroxy et 4-amino Glu à partir du Glu.

Hanessian et al.¹²² ont aussi obtenu le dérivé 4-hydroxylé majoritairement *syn* (9:1) par oxydation de l'acide glutamique protégé grâce au réactif de Davis (3-phényl-N-phénylsulfonyloxaziridine) (**schéma 5**).

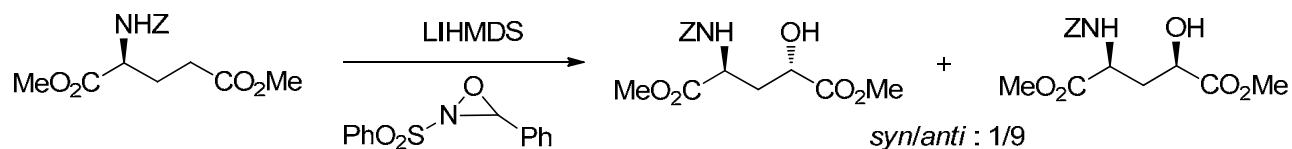


Schéma 5 : synthèse du 4-hydroxy-Glu.

¹²⁰ V. P. Krasnov, I. M. Bukrina, M. I. Kodess, M. A. Korolyova *Synthesis* **1994**, 4, 961-964.

¹²¹ V. P. Krasnov, A.I. Kodess *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2007, 4257-4266.

¹²² S. Hanessian, B. Vanasse *Can. J. Chem.* **1993**, 71, 1401-1406.

Des analogues substitués en position 3 ont aussi été préparés à partir du Glu. En 1993, Paz et al.¹²³ ont effectué la synthèse du 3-méthylGlu par addition conjuguée du diméthyl cuprate de lithium sur le dérivé (3,4)-didéhydro-Glu. Ce composé a été préparé au préalable, à partir du Glu, après introduction d'un groupement phenylsélényl en position 4, oxydation et élimination. La réaction d'addition n'est pas stéréosélective mais il est facile de séparer les deux diastéréoisomères car seul l'isomère *érythro* se cyclise spontanément (**schéma 6**).

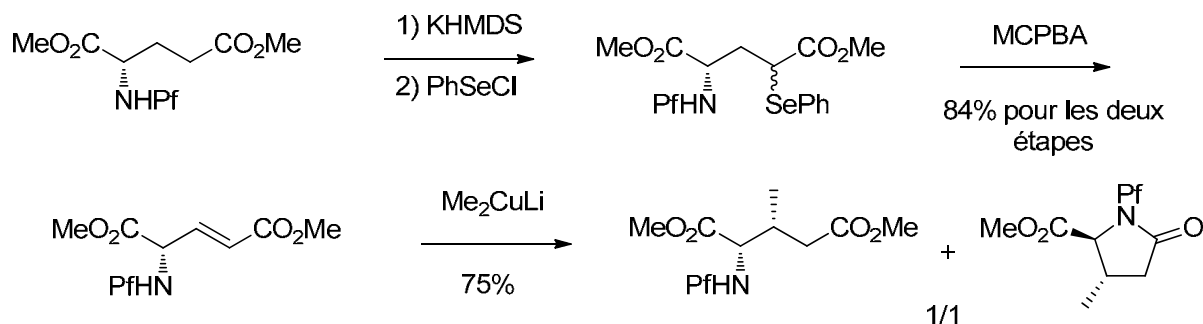


Schéma 6 : synthèse du 3-méthyl-Glu à partir du Glu.

2.2 Synthèses à partir de l'acide pyroglutamique (pGlu)

Plusieurs dérivés du Glu substitués sur la position 3 ou 4 ont été préparés par substitution du pGlu suivie d'une hydrolyse acide ou basique (**schéma 7**).

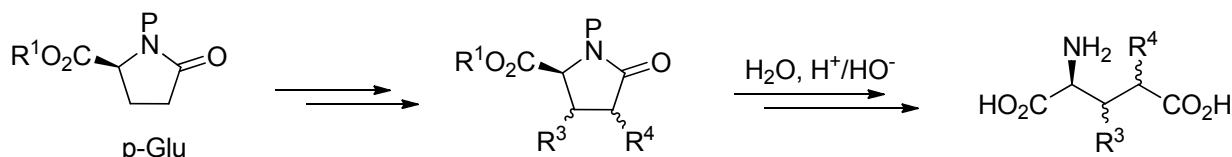


Schéma 7 : synthèse d'analogues du Glu à partir du pGlu.

Tout comme pour le Glu, l'alkylation ou l'aldolisation du pGlu protégé peut se faire directement en présence d'une base forte comme le LDA ou le LHMDS. L'amide du pGlu a été généralement protégé par un BOC. L'acide carboxylique peut être réduit en alcool et protégé par un groupement silyle encombrant pour assurer la régiosélectivité et la stéréosélectivité de l'alkylation (**tableau 4**). L'acide carboxylique du pGlu a aussi été protégé sous la forme d'un ester benzylique, éthylique ou *tert*-butylique. La présence de ces

¹²³ M. M. Paz, F. J. Sardina, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6990-6995.

groupements favorise l'approche de l'électrophile sur la face la moins encombrée. Ainsi, le dérivé *trans*-pGlu est obtenu majoritairement et donne après hydrolyse l'analogue du Glu de configuration relative L-(2,4)-*syn* (**tableau 4**). Notons par ailleurs que, comme pour l'alkylation directe du Glu, des électrophiles activés ont été utilisés.

R^2	Base	électrophiles	Stéréosélectivité syn / anti	Réf
CH_2OTBS	LDA	BnBr	15/1	Hon et al. ¹²⁴
CO_2Bn CO_2Et	LHMDS	$\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{Br}$	2/1	Bleakman et al. ¹²⁵ Ezquerria et al. ¹²⁶
CO_2tBu	LHMDS	PhCHO	100/0	Hokelek et al. ¹²⁷

Tableau 4 : substitution directe en position 3 du pGlu protégé.

La protection par des groupements volumineux (CH_2OTBS ou CO_2tBu) assure une bonne stéréosélectivité. Dans les cas de protection par un ester éthylique ou benzylique, les mélanges de diastéréoisomères, ont été séparés par chromatographie avant l'étape d'hydrolyse du lactame.

Des dérivés 4-alkyl-Glu ou 4-arylalkyl Glu ont été préparés selon une autre approche mettant en jeu la réduction du dérivé 4-alkylidène obtenu par condensation aldolique.¹²⁸ Le dérivé 4-méthyl Glu, quant à lui, a été préparé à partir d'un précurseur énaminone obtenu avec le réactif de Brederick.¹²⁹ Dans les deux cas l'hydrogénation catalytique de l'énaminone¹²⁵ a

¹²⁴ Y. S. Hon, Y. C. Chang, M. L. Cong *Heterocycles* **1990**, 31, 191-195.

¹²⁵ D. Bleakman *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1958-1968.

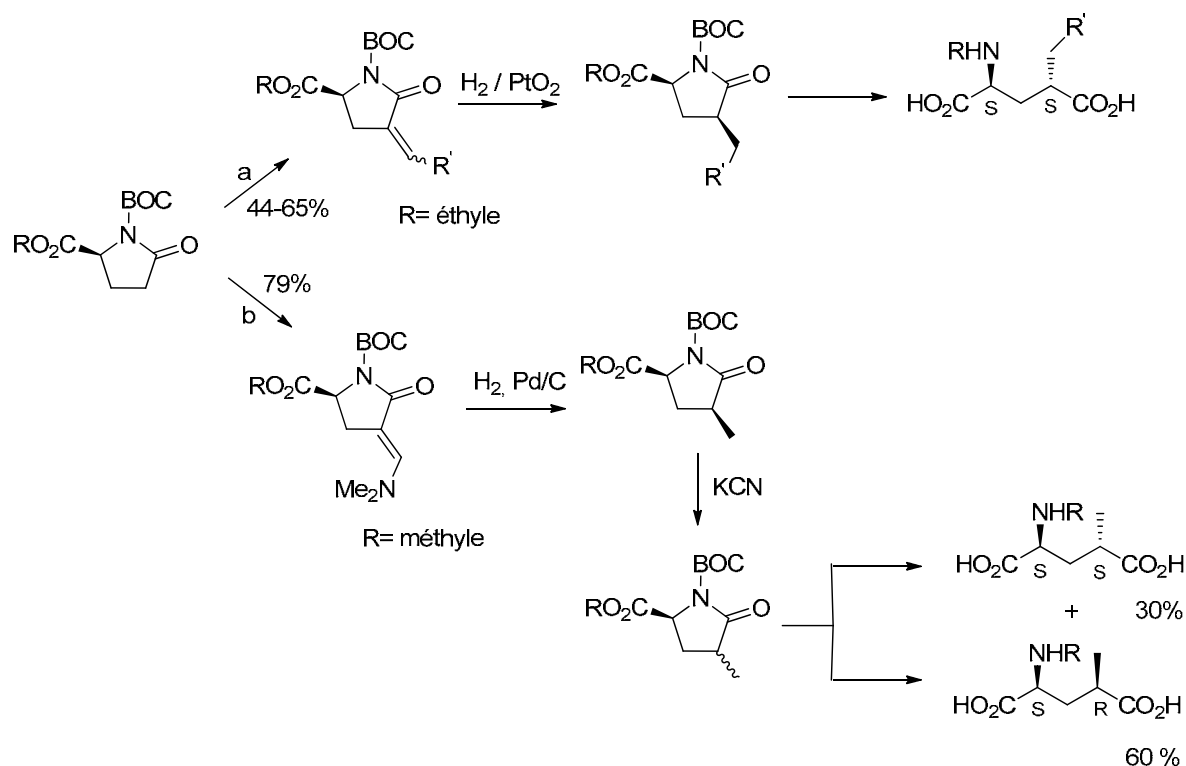
¹²⁶ J. Ezquerria, C. Pedregal, A. Rubio, A. Escibano, F. Sánchez-Ferrando *Tetrahedron* **1993**, 49, 8665-8678.

¹²⁷ J. E. Baldwin, T. Miranda, M. Moloney, T. Hokelek *Tetrahedron* **1989**, 45, 7459.

¹²⁸ J. Ezquerria, C. Pedregal, A. Yrretagoyena *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2925-2930.

¹²⁹ E. Coudert, F. Acher, R. Azerard *Synthesis* **1997**, 863-865.

permis d'obtenir le dérivé cyclique de configuration *cis* majoritaire qui conduit à des analogues du Glu L-(2,4)-*anti* (**schéma 8**). De plus, une épimérisation du 4-méthyl-pGlu en présence de KCN a permis d'accéder (après purification par chromatographie) à l'isomère *syn* du L-4-méthyl-Glu.¹²⁶



Conditions a : 1) LHMDS, R'CHO, Et₂O.BF₃ 2) MsCl, Et₃N b : (Me₂N)₂CHOtBu.

Schéma 8 : synthèse de 4-alkyl et 4-arylalkyl-Glu à partir du pGlu.

L'addition d'un magnésien sur le dérivé énaminone précédemment décrit et jouant le rôle d'accepteur de Michael, a également offert un accès à une variété de 4-alkyl-Glu de configuration L-(2,4)-*anti* (**schéma 9**). Cette approche a ainsi permis de contourner la difficulté de l'alkylation directe du pGlu par des électrophiles non activés.¹³⁰

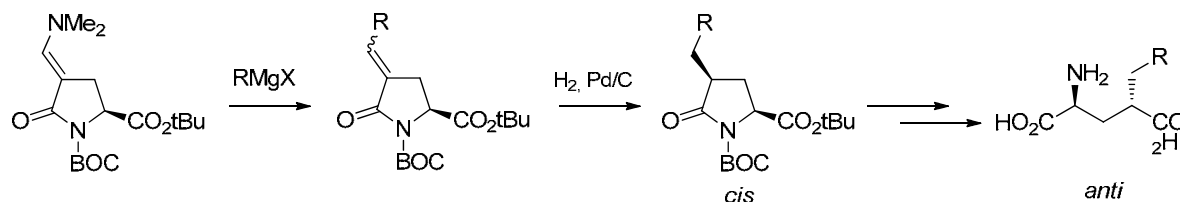


Schéma 9 : synthèse de 4-alkyl-Glu à partir d'un dérivé énaminone.

¹³⁰ C.M. Moody *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 3519-3530.

Récemment, la *trans*-4-hydroxy-L-proline protégée a été également utilisée pour la synthèse du dérivé 4-benzyloxyGlu. Après acétylation de l'alcool en position 4, une oxydation permet d'accéder au dérivé pGlu qui conduit après 4 étapes supplémentaires à l'analogue du Glu de configuration *syn*. Pour accéder à l'isomère *anti*, une épimérisation en position 4 a été réalisée via une réaction de Mitsunobu (**schéma 10**).¹³¹

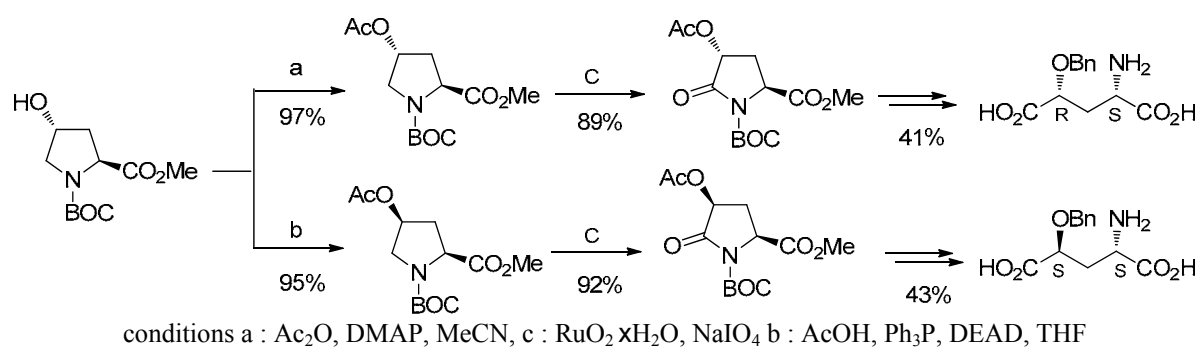


Schéma 10: Synthèse du L-4-benzyloxy-Glu.

Comme dans le cas du Glu, le dérivé 3,4-didéhydro a permis d'accéder à des analogues du Glu substitués en 3 ainsi qu'à des composés cycliques. Herdeis et al.¹³² ont synthétisé le (2*S*,3*R*)-3-chlorophénylGlu via l'addition conjuguée d'un organomagnésien sur un dérivé 3,4-didéhydro du pyroglutaminol (**schéma 11**). La réaction d'addition conduit avec un rendement de 60 % à l'isomère *trans* majoritaire.

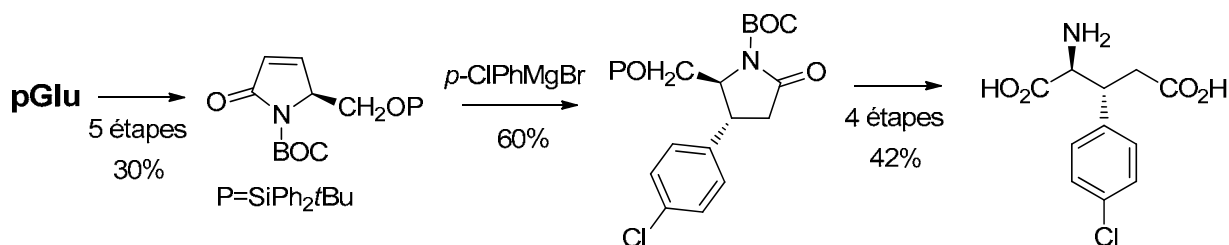


Schéma 11 : synthèse d'un analogue du Glu substitué en 3 à partir du pGlu.

La même stratégie a été adoptée pour synthétiser le (2*S*,3*S*)-3-méthylGlu à partir du même dérivé pyroglutaminol. La méthylation utilisant du diméthylcuprate de lithium donne exclusivement l'isomère *trans* (**schéma 12**).^{133, 134, 135}

¹³¹ L. Tamborini, P. Conti, A. Pinto, S. Colleoni, M. Gobbi, C. De Micheli *Tetrahedron* **2009**, 65, 6083-6089.

¹³² C. Herdeis, H. P. Hubmann, H. Lotter *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 351-354.

¹³³ C. Herdeis, B. Kelm *Tetrahedron* **2003**, 59, 217-229.

¹³⁴ M. Oba, T. Saegusa, N. Nishiyama, K. Nishiyama *Tetrahedron* **2009**, 65, 128-133.

¹³⁵ C. Milne, A. Pwell, J. Jim, C. P. Smith, J. Micklefield *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11250-11259.

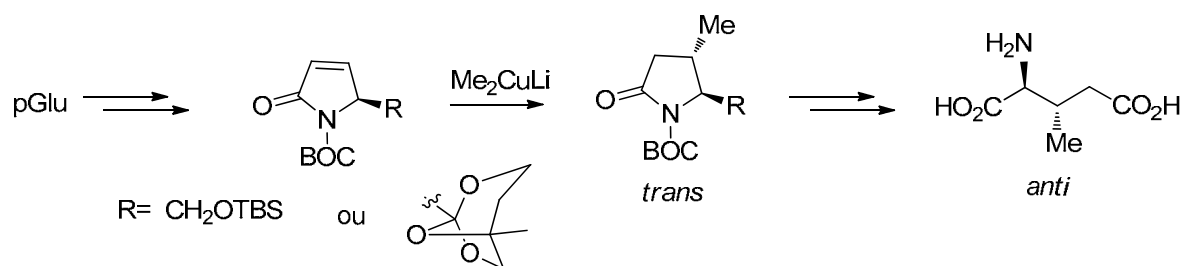


Schéma 12 : synthèse du 3-méthylGlu à partir du pGlu.

L'autre isomère (2,3-*syn*) a pu être préparé à partir du même dérivé didéhydro via la formation diastéréosélective d'une pyrazoline par cycloaddition du diazométhane. Après thermolyse et hydrogénation catalytique, l'isomère *cis* du 4-méthyl-pGlu a été obtenu (schéma 13).¹³²

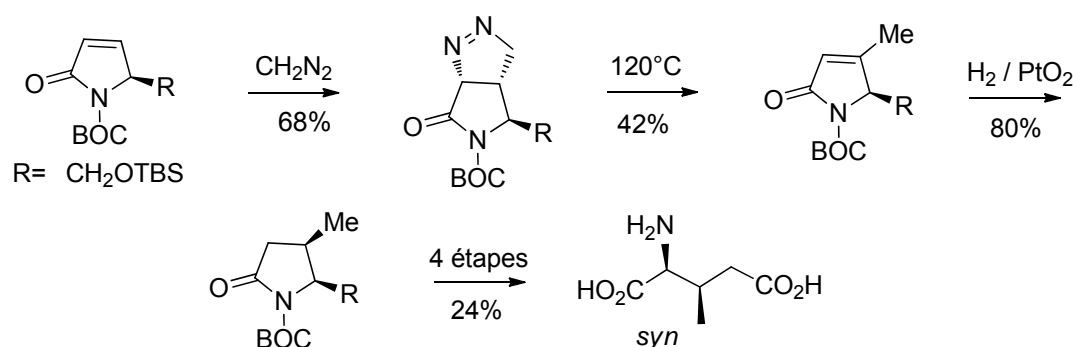


Schéma 13 : synthèse du 3-méthylGlu à partir du pGlu.

Le dérivé 3,4 didéhydro a aussi permis de préparer des analogues contraints par cyclopropanation¹³⁶ ou photocycloaddition (2+2) (schéma 14).¹³⁷

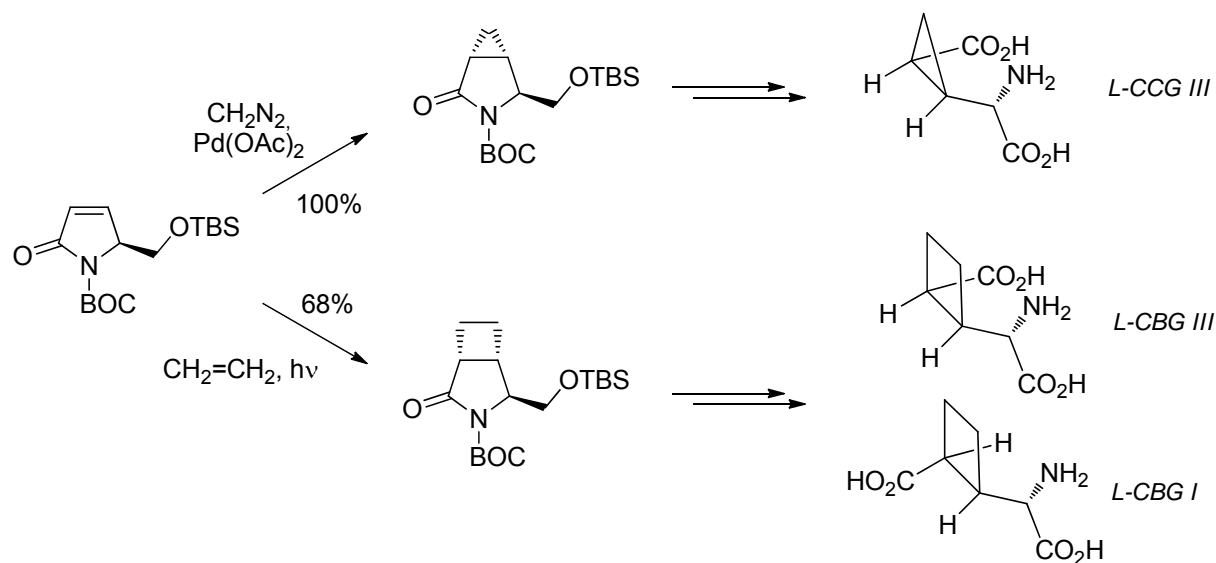


Schéma 14 : formation d'analogues contraints du Glu à partir du pGlu.

¹³⁶ K. Shimamoto, M. Ishida, H. Shinozaki, Y. Ohfuné *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4167-4176.

¹³⁷ H. Tsujishima, K. Nakatani, K. Shimamoto, N. Yumoto Y. Ohfuné *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1193-1196.

2.3 Synthèse d'analogues du Glu par formation de la liaison C²-C³

La condensation de la glycine protégée sur un acrylate substitué en présence d'une base forte permet d'accéder à des analogues du Glu généralement substitués en position 3.¹³⁸ Si les groupements protecteurs sont assez encombrants, la réaction est stéréosélective en faveur de l'isomère (2,3)-*syn* (**schéma 15**).

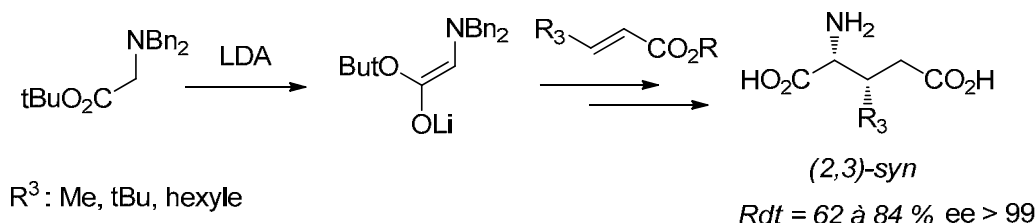


Schéma 15 : condensation de la glycine protégée sur un acrylate substitué.

Plusieurs exemples de condensation de dérivés imines de la glycine ont été décrits. L'utilisation de cétones chirales, par exemple du camphre a permis de préparer de façon stéréosélective plusieurs analogues de configuration *anti* avec des rendements de 60 à 88 % et des excès diastéréomériques supérieurs à 90 % (**schéma 16**).¹³⁹

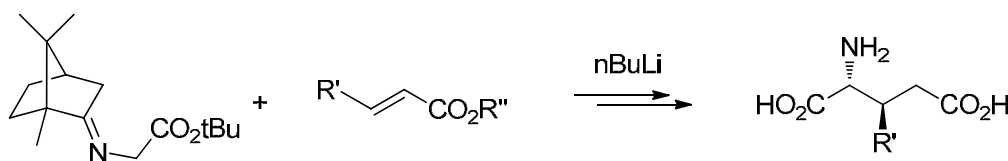


Schéma 16 : utilisation du camphre en tant qu'auxiliaire chiral.

La 2-hydroxypinan-3-one a également été utilisée comme inducteur chiral^{140,141} : la sélectivité faciale de l'énolate est relativement bonne et permet un bon contrôle de la configuration du carbone 2. Cependant la diastéréosélectivité de cette réaction est très faible car l'approche de l'acrylate peut se faire suivant ses deux faces (**schéma 17**).

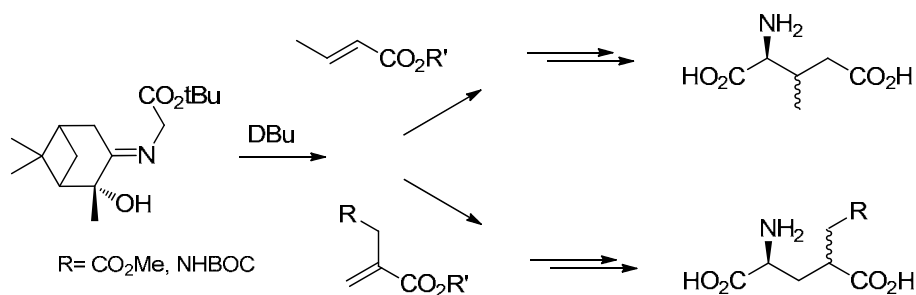


Schéma 17 : utilisation de dérivés imines chiraux de la glycine.

¹³⁸ M. Yamaguchi, K. Torisu, T. Minami *Chem. Lett.* **1990**, 377-380.

¹³⁹ S. Kanemasa, A. Tatsukawa, E. Wada *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2875-2883.

¹⁴⁰ J. Wehbe, V. Rolland, M.L. Roumestant, J. Martinez *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 1123-1126.

¹⁴¹ J. Wehbe, V. Rolland, A. Fruchier, J. Martinez *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 851-858.

La glycine a également été utilisée sous la forme de diimide. La condensation entre la glycine et la valine forme un diimide cyclique qui a permis la préparation de divers 3-alkyl-Glu avec une excellente stéréosélectivité (**schéma 18**).^{142, 143}

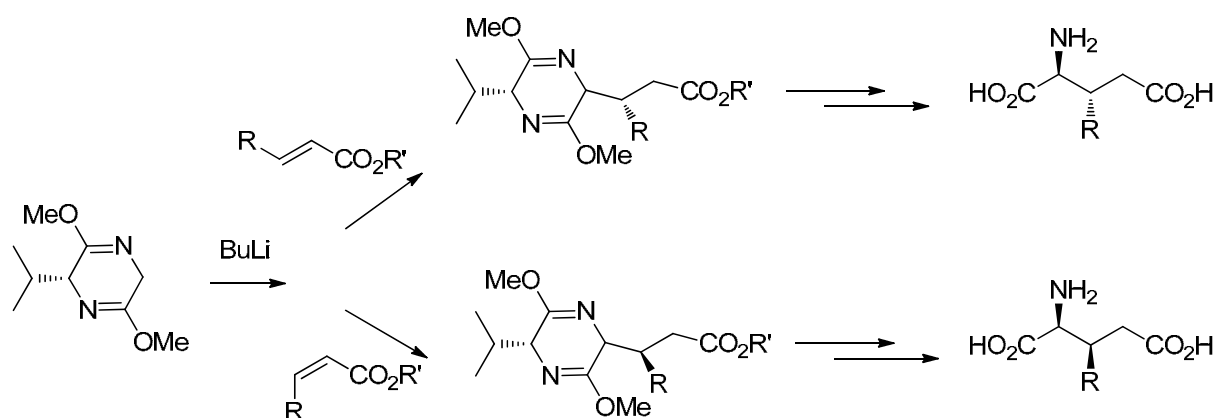


Schéma 18 : synthèse d'analogues du Glu substitués en position 3 par alkylation d'un diimide dérivé de Gly.

Kobayashi et coll¹⁴⁴ ont récemment préparé le (2*R*,3*R*)-3-méthylGlu. Ils ont montré que l'utilisation d'un complexe chiral formé à partir de $\text{Ca}(\text{OiPr})_2$ et du ligand **A** permet d'obtenir le L-*anti*-3-méthylGlu avec un rendement de 97 % et une excellente stéréosélectivité ($ee > 99$, $de > 99$ %) (**schéma 19**).

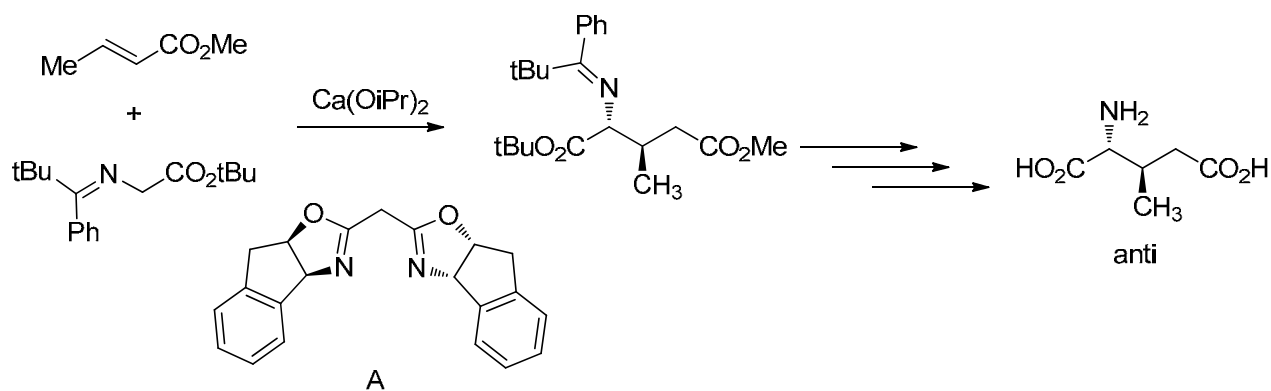


Schéma 19 : synthèse du (2*R*,3*R*)-3-méthylGlu.

Des acrylates estérifiés par des alcools chiraux ont aussi été utilisés avec des dérivés de la glycine pour la synthèse asymétrique d'analogues du Glu. Nous pouvons citer l'exemple de la condensation d'un dérivé imine de la glycine sur un bromoacrylate chiral suivie d'une substitution nucléophile intramoléculaire, qui a permis la formation d'un des isomères de la 2-

¹⁴² W. Hartwig, L. Born *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4352-4358.

¹⁴³ B. Hartzoulakis, D. Gani *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 2525-2531.

¹⁴⁴ S. Kobayashi, T. Tsubogo, S. Saito, Y. Yamashita *Org. Lett.* **2008**, 10, 807-809.

(carboxycyclopropyl)glycine (L-CCG I) avec un rendement global de 37 % et un excès énantiomérique de 97 % (**schéma 20**).¹⁴⁵

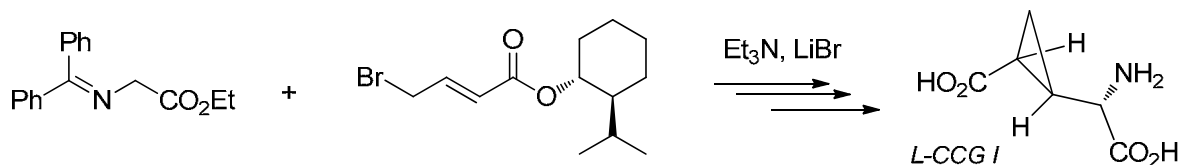


Schéma 20 : synthèse du L-CCGI à partir d'un acrylate chiral.

La combinaison d'un complexe à base de nickel achiral et d'une N-acryloyloxazolidinone homochirale a permis de préparer plusieurs pyroglutamates substitués en position 3 avec des rendements supérieurs à 95 % et des diastéréosélectivités très bonnes (de = 88-98 %) (**schéma 21**).¹⁴⁶

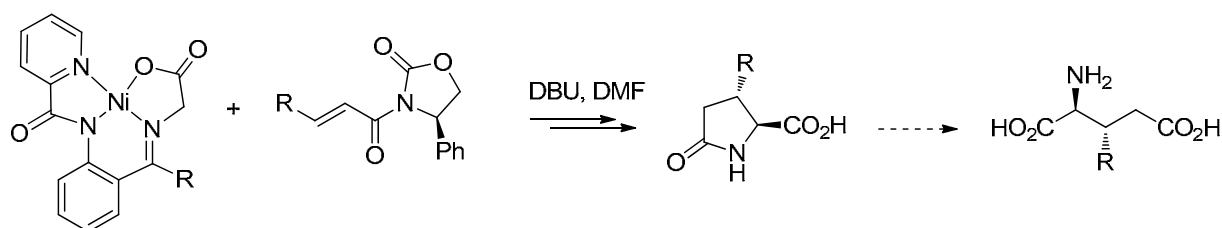


Schéma 21 : utilisation d'un accepteur de Michael chiral pour la préparation d'analogues du Glu.

Notons de même que le pGlu a également été utilisé comme auxiliaire chiral lié à l'acrylate.¹⁴⁷

2.4 Synthèse d'analogues du Glu par formation de la liaison C³-C⁴

La sérine a été utilisée comme précurseur dans différentes synthèses d'analogues du Glu. Plusieurs d'entre-elles mettent en jeu l'aldéhyde de Garner préparé à partir de la sérine protégée (**schéma 22**).

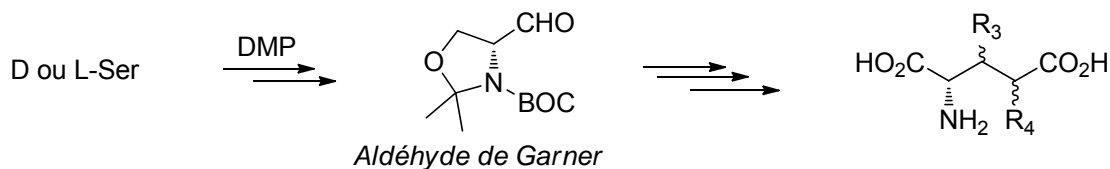


Schéma 22 : synthèses d'analogues du Glu mettant en jeu l'aldéhyde de Garner.

¹⁴⁵ S. P. Chavan, P. Sharma, R. Sivappa, U. R. Kalkote *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6817-6819.

¹⁴⁶ V. A. Soloshonok, H. Ueki, R. Tiwari, V. J. Hruby *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4984-4990.

¹⁴⁷ C. Cai, T. Yamada, R. Tiwari, V. J. Hruby, V. A. Soloshonok *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 6855-6858.

Ainsi, des réactions d'aldolisations offrent un accès à des dérivés hydroxylés en position 3 (**schéma 23**).¹²⁹

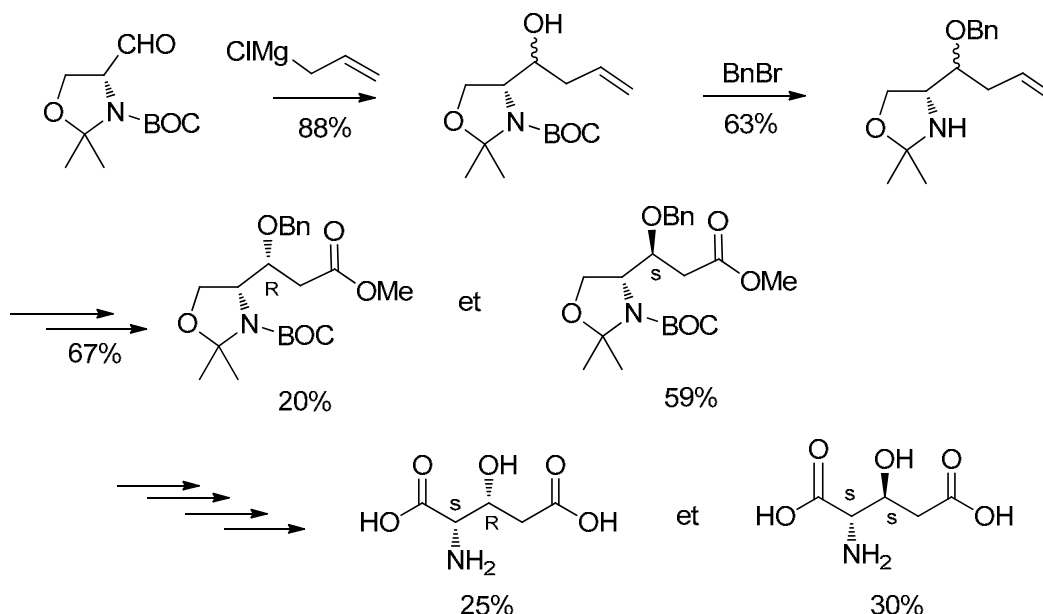


Schéma 23 : synthèse des dérivés (2*S*,3*R*) et (2*S*,3*S*)-3-hydroxy-Glu à partir d'un dérivé de l'aldéhyde de Garner.

Après réaction avec le chlorure d'allylmagnésium et protection par un groupement benzyle, la double liaison subit une coupure oxydante qui permet d'obtenir deux diastéréoisomères séparable par chromatographie, précurseurs des deux diastéoisomères (2*S*,3*R*) et (2*S*,3*S*)-3-hydroxy-Glu.

Des dérivés alkylés en position 3 ont aussi été préparés à partir de l'aldéhyde de Garner. Ainsi, une réaction de Wadworth-Emmons permet de préparer l'intermédiaire **A**. L'addition diastéréosélective de dialkyl-cuprates sur cet intermédiaire a conduit à plusieurs analogues substitués en position 3 possédant majoritairement la configuration *syn* (**schéma 24**).^{148,149}

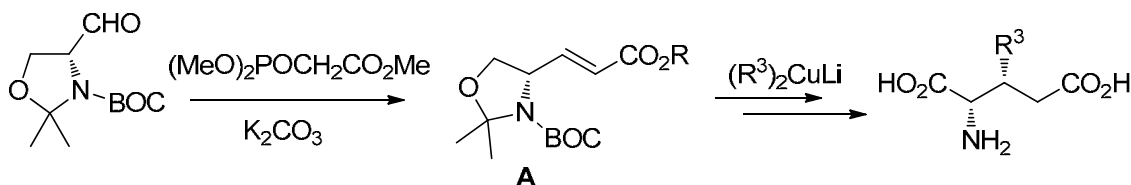


Schéma 24 : synthèse d'analogues du Glu substitués en position 3, à partir de l'aldéhyde de Garner.

¹⁴⁸ I. Jako, P. Uiber, A. Mann, C-G. Wermuth *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5729-5733.

¹⁴⁹ M. Hashimoto, K. Hashimoto, H. Shirahama *Tetrahedron* **1996**, 52, 1931-1942.

L'alkylation du produit de réduction de **A** a été également mise en œuvre pour préparer des analogues substitués en position 4. Cependant l'alkylation n'est pas diastéréosélective. Cette réaction a été utilisée pour préparer les (4*R*) et (4*S*)-4-(4,4-diphénylbutyl)-L-Glu qui ont été séparés par chromatographie (**schéma 25**).¹⁵⁰

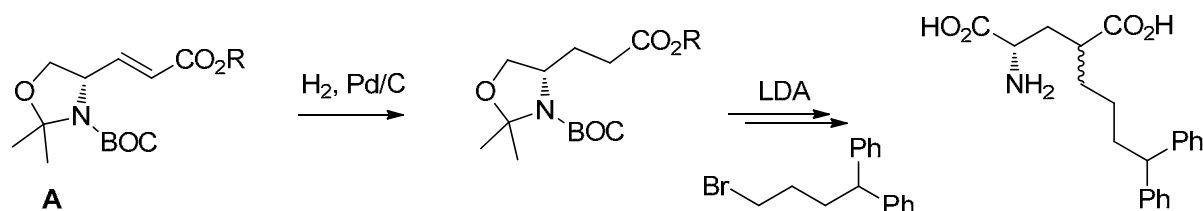


Schéma 25 : synthèse d'analogues alkylés en 4 à partir de l'aldéhyde de Garner.

La réaction de l'aldéhyde de Garner (protégé par un groupement Z) avec le malonate de *tert*-butyle offre également un accès à l'acide L- γ -carboxyglutamique (L-Gla), un analogue fonctionnalisé en position 4 (**schéma 26**).¹⁵¹

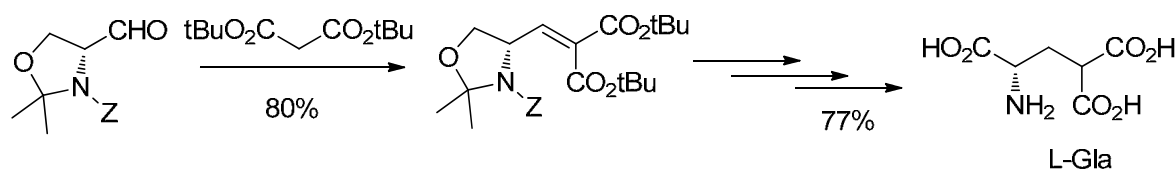
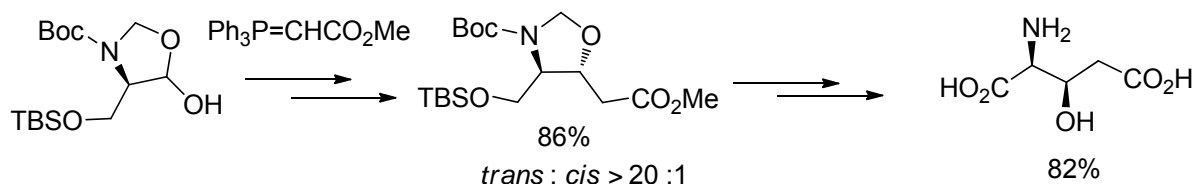


Schéma 26: synthèse du L-Gla à partir de l'aldéhyde de Garner.

L'intermédiaire **A** a également été engagé dans des réactions de cyclopropanations pour préparer plusieurs analogues contraints.^{152, 153}

Une approche alternative utilisant un composé proche de l'aldéhyde de Garner (préparé à partir de la sérine en 4 étapes) a été récemment utilisé par Kim et al. pour la préparation du 3-hydroxy-Glu.¹⁵⁴ Une réaction de Wittig suivie d'une addition conjuguée intramoléculaire conduit de façon stéréosélective à un précurseur du (2*S*,3*R*)-3-hydroxyGlu (**schéma 27**).



¹⁵⁰ C.G. Wermuth, A. Mann, J.P. Burnett, N.G. Mayne, D.D. Schoepp *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 814-816.

¹⁵¹ S. Jiang, C. C. Lai, J. A. Kelley, P. P. Roller *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 23-25

¹⁵² K. Shimamoto, Y. Ohfuné *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 407-423.

¹⁵³ I. Collado, C. Pedregal, A. E. Kingston *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3619.

¹⁵⁴ H. Kim, D. Yoo, S. Kwon, Y. G. Kim *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 2715-2719.

Schéma 27 : synthèse du (2*S*,3*R*)-3-hydroxy-Glu utilisant un dérivé de la sérine.

En conclusion, de nombreux travaux ont été effectués pour la synthèse d'analogues du Glu. Certaines méthodes permettent d'atteindre une très bonne stéréosélectivité. Cependant, aucune méthode générale ne permet d'accéder efficacement aux 2 types d'analogues substitués en 3 ou en 4 ou disubstitués sur ces positions. Enfin, très peu d'exemples d'introduction de groupements fonctionnalisés sur le squelette du Glu ont été décrits à ce jour.

D'autres méthodes au caractère moins général ont été développées pour accéder à des analogues du Glu. Parmi celle-ci, nous présenteront dans le paragraphe suivant, quelques méthodes chimio-enzymatiques permettant une préparation stéréosélective d'analogues du Glu.

2.5 Méthodes chimio-enzymatiques pour la synthèse asymétrique d'analogues du Glu

Plusieurs enzymes sont efficaces pour préparer des α -aminoacides énantiopurs via un dédoublement cinétique. Parmi celles-ci, les aminoacylases¹⁵⁵ ou encore la papaïne¹⁵⁶ ont été utilisées pour dédoubler des analogues de Glu substitués en position 4. La papaïne a été utilisée pour préparer les dérivés 4-méthyl-Glu : elle catalyse presque exclusivement l'amidification des L-aminoacides. Les diastéréoisomères *L-syn* et *L-anti* ont ensuite été séparés par chromatographie d'échange d'ions (**schéma 28**).

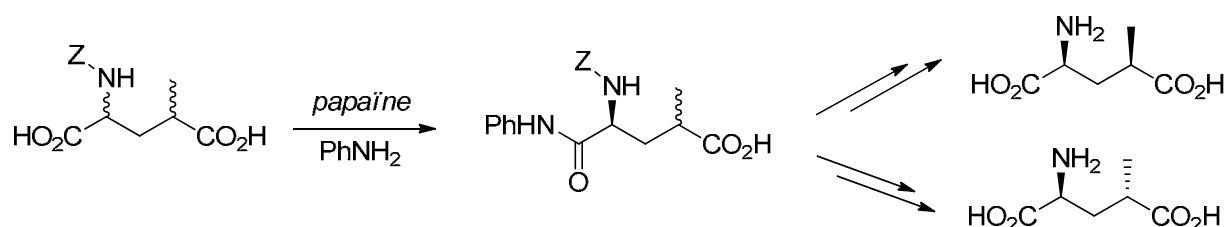


Schéma 28 : dédoublement cinétique du 4-méthyl-Glu catalysé par la papaïne.

Une aminoacylase (isolée du rein de porc) a également été utilisée pour dédoubler des analogues du Glu. Le schéma 29 présente l'exemple du dédoublement du 4-fluoroGlu.¹⁵²

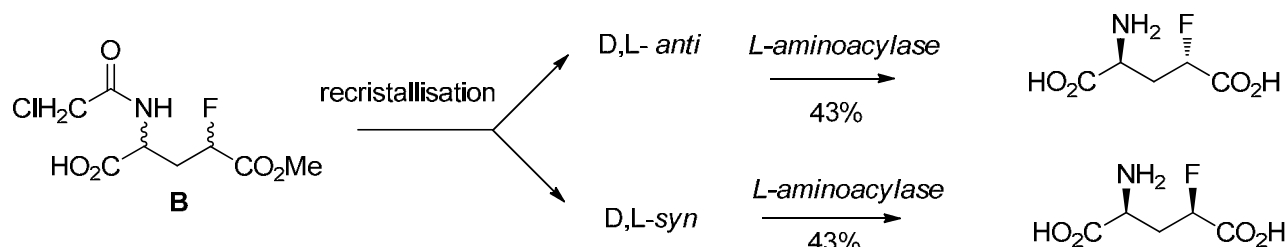


Schéma 29 : dédoublement du 4-fluoro-Glu en utilisant la L-aminoacylase du rein du porc.

¹⁵⁵ Y. Kokuryo, T. Nakatani, Y. Tamura, K. Kawada, M. Ohtani *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 3545-3551.

¹⁵⁶ Y. Nishida, H. Ohru, H. Meguro *Agric. Biol. Chem.* **1984**, 48, 1211-1216

Les 2 isomères produits ont été obtenus avec un rendement global d'environ 40 % et un excès énantiomérique supérieur à 99 %.

Les dérivés du Glu peuvent aussi être obtenus par amination réductrice du cétoacide correspondant. Ainsi, l'utilisation de la glutamate déshydrogénase (GluDH) a permis de préparer les (2*S*,4*R*) et (2*S*,4*S*)-4-méthyl-Glu.¹⁵⁷ Un système auxiliaire permet de régénérer le cofacteur NADH grâce à l'alcool déshydrogénase de levure (YADH). Les 2 isomères *L-syn* et *L-anti* ont été isolés après séparation par chromatographie d'échange d'ions avec des rendements respectifs de 30 et 35 %.

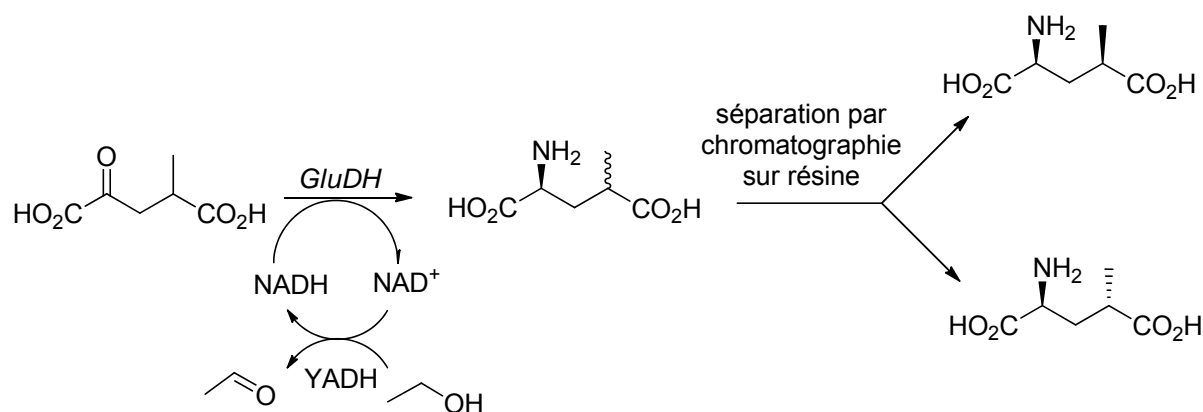


Schéma 30 : préparation des (2*S*,4*R*) et (2*S*,4*S*)-3-méthyl-Glu en utilisant la GluDH.

Le même système a été utilisé par Vidal-Cros et coll. pour préparer les (2*R*,3*R*) et (2*R*,3*S*)-3-fluoroGlu (schéma 31).¹⁵⁸ Les deux diastéréoisomères ont été obtenus avec un rendement de 39 % après purification sur résine.

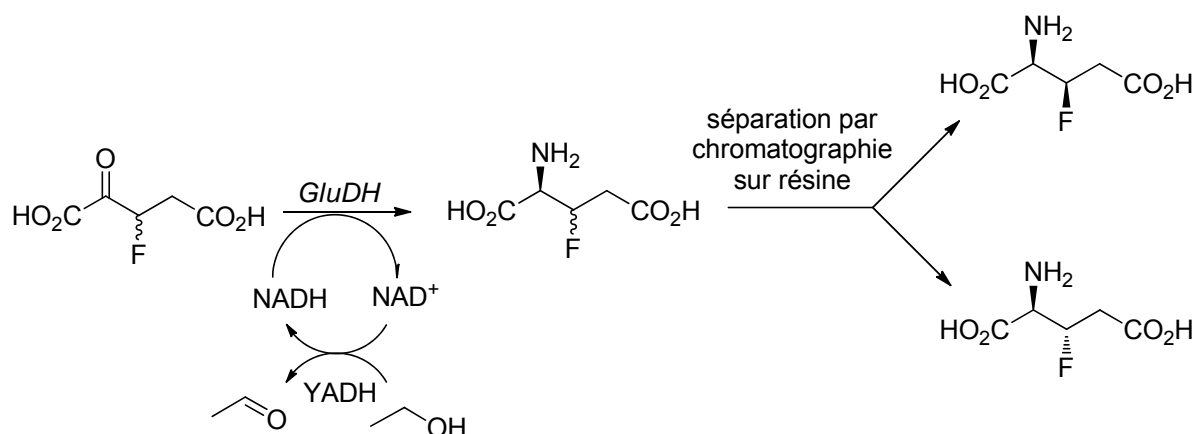


Schéma 31 : préparation des (2*R*,3*R*) et (2*R*,3*S*)-3-fluoroGlu en utilisant la GluDH.

¹⁵⁷ A. Righini-Tapie, R. Azerad *J. Appl. Biochem.* **1984**, 6, 361-366.

¹⁵⁸ A. Vidal-Cros, M. Gaudry, A. Marquet *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 498-500.

L'utilisation d'aminotransférases (AT) pour convertir des α -cétoacides en analogues du Glu constitue une alternative. Dans ce cas, le cofacteur n'a pas besoin d'être régénéré. Au laboratoire, l'utilisation d'AT telles que l'Aspartate Aminotransférase (AspAT) ou la Branched Chain Aminotransférase (BCAT) ont permis, ces dernières années, d'accéder à de nombreux analogues du Glu substitués en position 3 et/ou 4.

Comme dans le cas de l'utilisation de la GluDH, cette stratégie nécessite d'avoir accès facilement aux cétoacides correspondants. La mise au point de procédés biocatalytiques utilisant des ATs et le développement de méthodes générales pour la synthèse d'analogues de l'acide céto-glutarique, ont fait l'objet de nombreux travaux antérieurs. Ces derniers seront décrits dans la suite de cette étude bibliographique, à la suite d'une présentation générale des Aminotransférases et de leur utilisation en synthèse organique.

Chapitre 3 Les aminotransférases (ATs)

3.1 Diversité des aminotransférases

Le terme aminotransférase ou transaminase (EC.2.6.1.-) correspond à une classe d'enzymes nombreuses et variées. Elles catalysent le transfert réversible d'un groupement amino d'un substrat donneur d'amine vers un substrat carbonyle accepteur (**schéma 32**).

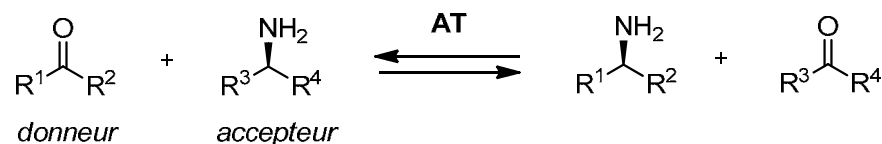


Schéma 32 : processus de transamination.

Les aminotransférases appartiennent à la grande famille des enzymes à pyridoxal-phosphate (PLP). Environ 90 aminotransférases sont à ce jour répertoriées dans la base de données BRENDA (EC.2.6.1- 90).¹⁵⁹

Sous-groupe	Enzyme	EC no.	Principaux substrats	
			Aminoacide	Oxoacide
I	AspAT	2.6.1.1.1	L-aspartate (Asp)	2-oxoglutarate (KG)
	AlaAT	2.6.1.1.2	L-alanine	2-oxoglutarate
	TyrAT	2.6.1.1.5	L-tyrosine	2-oxoglutarate
	HisPAT	2.6.1.1.9	L-histidinol-phosphate	2-oxoglutarate
	PheAT	2.6.1.1.58	L-phénylalanine	pyruvate
II	AcornAT	2.6.1.1.11	N-acétyl-L-ornithine	2-oxoglutarate
	OrnAT	2.6.1.1.13	L-ornithine	2-oxoglutarate
	ω-aaAT	2.6.1.1.18	β-alanine	pyruvate
	GabaAT	2.6.1.1.19	4-aminobutyrate	2-oxoglutarate
	DapaAT	2.6.1.1.62	7,8-diaminopélagonate	S-adenosyl-4-méthylthio-2-oxobutanoate
III	D-AlaAT	2.6.1.1.21	D-alanine	2-oxoglutarate
	BCAT	2.6.1.1.42	L-leucine	2-oxoglutarate
IV	SerAT	2.6.1.1.51	L-sérine	Pyruvate
	PserAT	2.6.1.1.52	L-sérine-3-phosphate	2-oxoglutarate

Tableau 5 : classification des aminotransférases.¹⁶⁰

¹⁵⁹ <http://www.brenda-enzymes.org/>

L'importante variété structurale des ATs explique la large gamme de substrats de cette classe d'enzyme. Il existe ainsi une classification des principales ATs suivant leur spécificité de substrat proposée par Mehta et col (**tableau 5**).¹⁶⁰

Une classification plus large des enzymes à pyridoxal basée sur les analogies structurales a été proposée par Grishin et al.¹⁶¹ Elle rassemble quasiment toutes les ATs dans un même sous groupe (groupe structural I dit « fold type I ») à l'exception de la BCAT et de la D-AlaAT (groupe IV). Ces deux sous groupes sont aussi appelés « famille de l'AspAT et de la D-AlaAT ».

La quasi-totalité des ATs présentent donc une structure commune : elle comporte un grand domaine composé d'un feuillet β entouré de boucles et d'hélices où le PLP est fixé, et d'un petit domaine qui ne participe que partiellement à la fixation du substrat (**figure 42**).

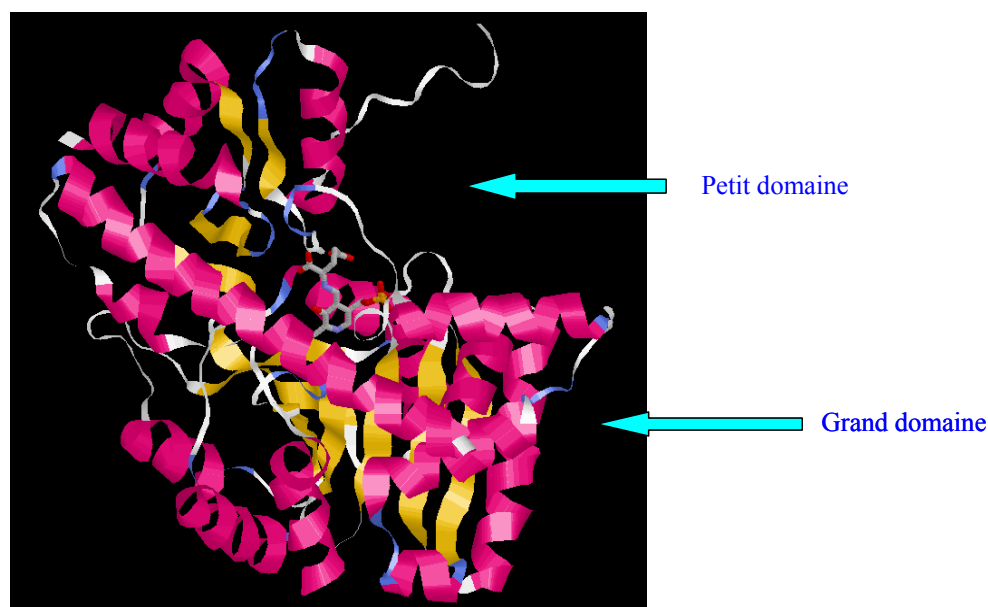


Figure 42 : Vue schématique d'une sous-unité de l'AspAT (structure PDB 1MAQ).

Les ATs sont, pour la plupart, actives exclusivement vis-à-vis des α -aminoacides de la série L et admettent comme substrats préférentiels le couple Glu/KG (**schéma 33**).

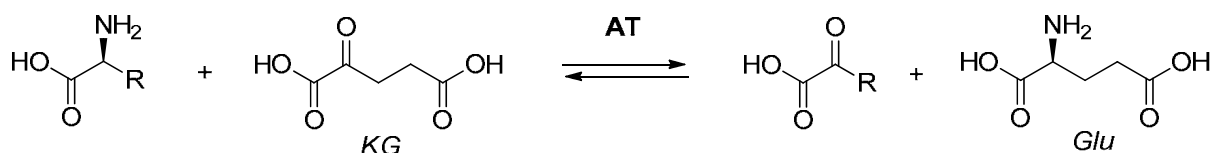


Schéma 33 : réaction générale catalysée par la plupart des aminotransférases.

¹⁶⁰ P.K. Mehta, T.I. Hale, P. Christen *Eur. J. Biochem.* **1993**, 214, 549-561.

¹⁶¹ V. Grishin, M.A. Phillips, E.J. Goldsmith *Protein Sci.* **1995**, 4, 1291-1304.

Les ATs interviennent ainsi dans le métabolisme des acides aminés protéinogènes. Les plus abondantes d'entre-elles assurent l'équilibre métabolique entre les cétoacides majeurs que sont le KG, le pyruvate, l'oxaloacétate et les acides aminés correspondants.

Un certain nombre d'ATs catalysent cependant des réactions différentes de celle décrite dans le **schéma 33**. Bien que les ATs soient, dans leur très grande majorité, spécifiques des L-aminoacides, plusieurs D-ATs ont été décrites. Ainsi la D-AlaAT (EC 2.6.1.21) a été isolée chez de nombreux microorganismes et se caractérise par un très large spectre de substrats. Certaines enzymes catalysent le transfert du groupement amino distant de la position α : la Lysine-KG AT (EC 2.6.1.36) ou l'ornithine-oxoacide transaminase (EC 2.6.1.13) transfèrent vers un α -cétoacide (KG, Pyruvate ou glyoxylate) la fonction amine en bout de chaîne pour conduire à un aldéhyde.

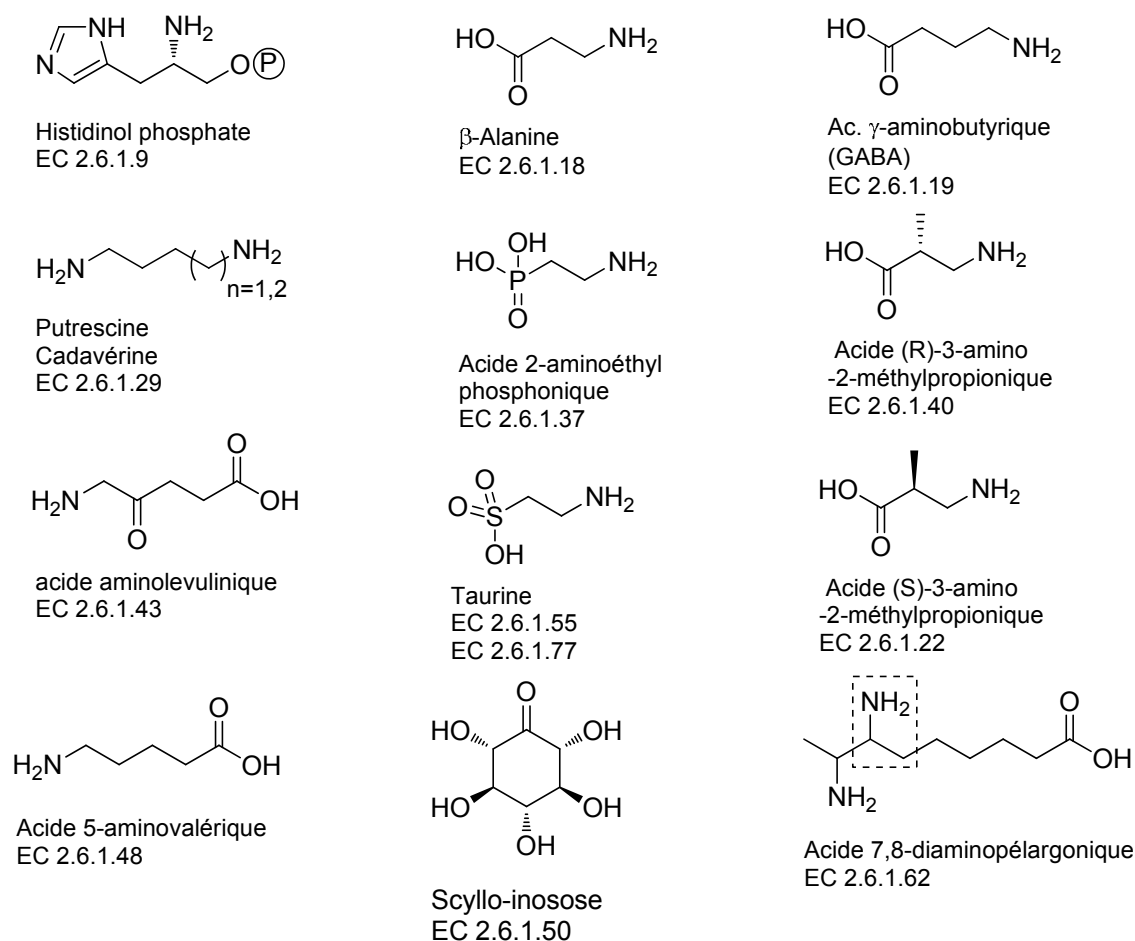


Figure 43: exemples de substrats d'aminotransférases.

D'autre part, des dérivés carbonylés et des amines dépourvues de fonction acide en position α sont les substrats de certaines ATs : on peut citer par exemple, l'histidinol

phosphate AT (EC 2.6.1.9) qui participe à la biosynthèse de l'histidine, la GABA-KG transaminase (EC 2.6.1.19) ou encore la β -alanine-pyruvate transaminase (EC 2.6.1.18). Les enzymes de ce type sont souvent regroupées sous le terme générique d' ω -transaminases. Plusieurs ont été isolées chez divers microorganismes. Elles présentent un large spectre de substrat et catalysent la transamination d'amines aussi simples que la n-butylamine. Enfin, plusieurs ATs participent à la synthèse d'aminosucres comme la glutamine-fructose-6-phosphate AT (EC 2.6.1.16) ou encore d'aminocyclitols comme la glutamine-scylo-inosose AT (2.6.1.50). La figure 4 regroupe des exemples de substrats d'aminotransférases différents des α -aminoacides.

3.2 Mécanisme d'action des aminotransférases

La réaction globale de transamination telle qu'elle est décrite dans le schéma 32 correspond à l'enchaînement de 2 réactions mettant en jeu le coenzyme. La réaction globale obéit à un modèle cinétique de type ping-pong (**schéma 34**).

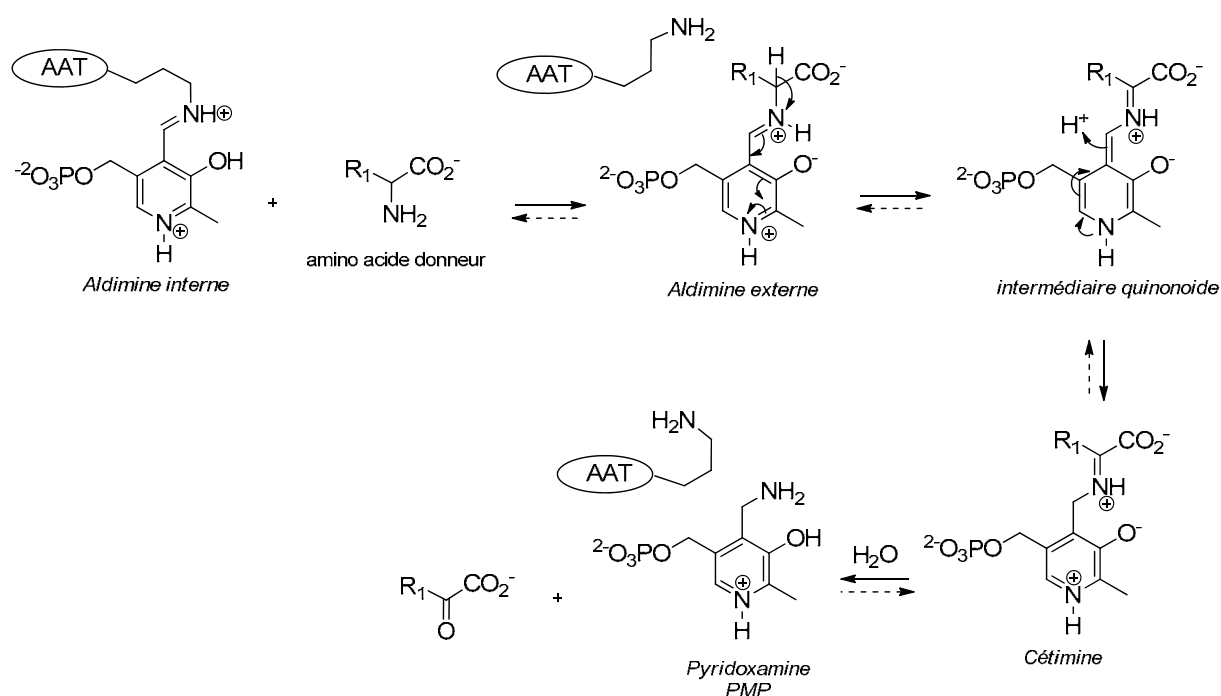


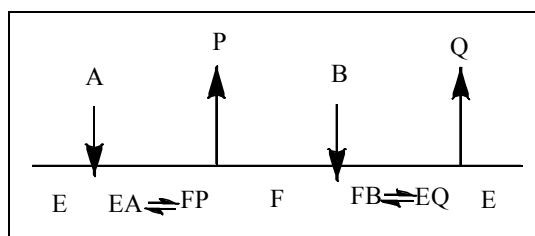
Schéma 34: première demi réaction : conversion du pyridoxal phosphate (PLP) en pyridoxamine phosphate (PMP).

Au cours de la première demi-réaction, la première étape correspond à une transamination entre l'acide aminé donneur et le coenzyme (PLP) initialement engagé dans une fonction imine avec un résidu lysine du site actif. Ce résidu est conservé chez toutes les enzymes à pyridoxal. L'acide aminé donneur activé par sa liaison au coenzyme, subit une

déprotonation en position α conduisant à l'intermédiaire quinonoïde. Celui-ci peut être reprotoné au niveau du carbone 2 du coenzyme pour produire l'intermédiaire cétimine. L'hydrolyse de ce dernier libère le cétoacide et le coenzyme sous forme de pyridoxamine. La seconde demi-réaction correspond exactement au processus inverse mettant en jeu le cétoacide accepteur, fixé au site actif après libération du cétoacide formé à partir de l'acide aminé donneur.

Aspect cinétique

La réaction de transamination catalysée par les ATs obéit à un modèle cinétique de type « ping pong » BiBi.¹⁶² Elle peut être schématisée selon la représentation de King-Altman (**figure 44**).



E : enzyme libre (liée au PLP), A : aminoacide 1 donneur entrant, P : cétoacide 1 produit,
F : enzyme liée au PMP, B : cétoacide accepteur 2 entrant, Q : aminoacide 2 produit

Figure 44 : représentation de King-Altman.

L'exploitation mathématique de ce modèle permet, en travaillant en mesure de vitesse à l'état quasi-stationnaire, de formuler une équation où l'inverse de la vitesse de transamination est une fonction linéaire qui dépend des concentrations en substrat A et B.

On obtient ainsi l'équation suivante :

$$1/V = K_{mA}/(V_{\max} [A]) + 1/V_{\max} (1 + K_{mB}/[B])$$

Cette dernière relation peut se simplifier en travaillant en concentration saturante en l'un des deux substrats. Ainsi si [A] est très importante, le premier terme devient négligeable et l'équation devient la suivante :

$$1/V = 1/V_{\max} (1 + K_{mB}/[B])$$

Il est donc relativement aisé dans ces conditions d'estimer les paramètres cinétiques relatifs aux différents substrats des ATs.

¹⁶² H. Segel, « Enzyme Kinetics », **1993**, Wiley Classic Library.

3.3 Utilisations des ATs en synthèse organique

Les ATs ont été utilisées pour la préparation stéréosélective d'acides aminés protéinogènes, rares ou encore non naturels. Récemment les ω -transaminases ont permis d'étendre le potentiel synthétique à une grande variété d'amines chirales.

3.3.1 Méthodes de déplacement de l'équilibre de transamination

Comme nous l'avons déjà souligné, la réaction de transamination est réversible et elle présente souvent une constante d'équilibre proche de 1. Afin d'optimiser le rendement de la transamination en synthèse, il est donc nécessaire de déplacer son équilibre en faveur du composé souhaité. Dans cette optique, il peut être suffisant d'employer un excès d'acide aminé donneur qui est en général le substrat le moins coûteux.

D'autre part, si l'un des produits est éliminé au cours de la réaction, l'équilibre est déplacé. Ainsi, suivant la nature de l'acide aminé donneur choisi, le cétoacide correspondant pourra être éliminé au fur et à mesure de sa formation soit par précipitation, par évaporation ou encore par transformation chimique (**schéma 35**). Plusieurs procédés biocatalytiques qui reposent sur ce principe, ont été développés. Dans chaque cas, le choix de l'acide aminé donneur est primordial.

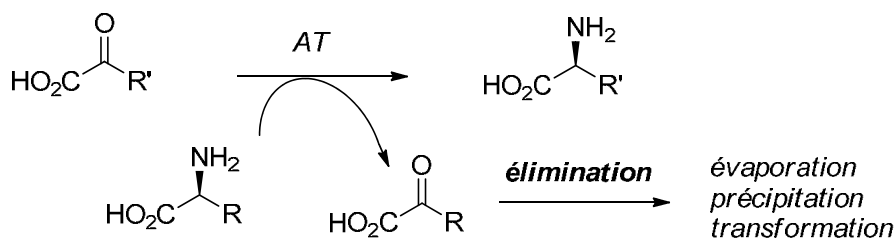


Schéma 35 : déplacement de l'équilibre de transamination par élimination du cétoacide formé.

3.3.1.1 Utilisation de l'acide Aspartique (Asp) en tant que substrat donneur

Au cours de la transamination, l'Asp est converti en acide oxaloacétique (OA). Ce dernier est un β -cétoacide et peut donc se décomposer en pyruvate et CO_2 . Cette décarboxylation est assez lente en milieu neutre ou légèrement basique, mais elle peut-être catalysée par des ions métalliques tels que Mn^{2+} ou Mg^{2+} ¹⁶³, ou par des enzymes comme l'oxaloacétate décarboxylase.¹⁶⁴ Bien sûr, ce procédé n'est envisageable que si l'Asp est substrat de l'AT et implique aussi que l'AT ne soit pas active vis-à-vis du pyruvate. Nous pouvons citer l'exemple récent du procédé mis au point pour la synthèse des acides (2S)-2-

¹⁶³ J. F. Walter, M. B. Sherwin, **1989**, *US patent 485859*.

¹⁶⁴ J. D. Rozell, **1985**, *US Patent 4518692 et 4525454*.

amino-4-oxo-4-phenylbutyrique et (3*E*,2*S*)-2-amino-4-phenylbuténoïque utilisant l'AroAT, surexprimée dans une souche d'*E. coli* (schéma 36).¹⁶⁵ Les L-aminoacides ont été obtenus avec des rendements de 68 à 78 % et un excès énantiomérique supérieur à 99 %.

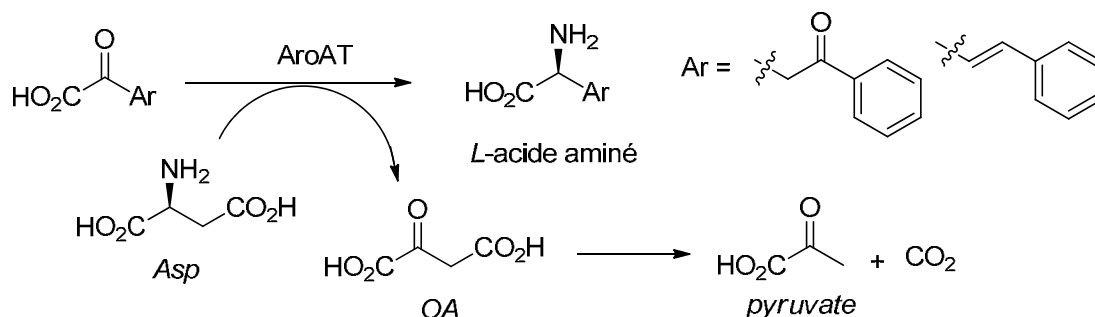


Schéma 36 : synthèse d'aminoacides catalysée par l'AroAT.

Dans le cas où le pyruvate est substrat de l'AT, l'Acéto Lactate Synthétase (ALS) a été utilisée pour éliminer le pyruvate. Ce procédé a été mis en œuvre lors de l'utilisation de la D-aaAT et de la TyrAT pour la synthèse des acides D- et L- α -aminobutyriques comme le schéma ci-dessous le montre.^{166, 167, 168} Dans le cas de la synthèse de l'acide D-aminobutyrique, le D-Asp utilisé comme donneur d'amine a été obtenu à partir du L-Asp en utilisant une Aspartate racémase.

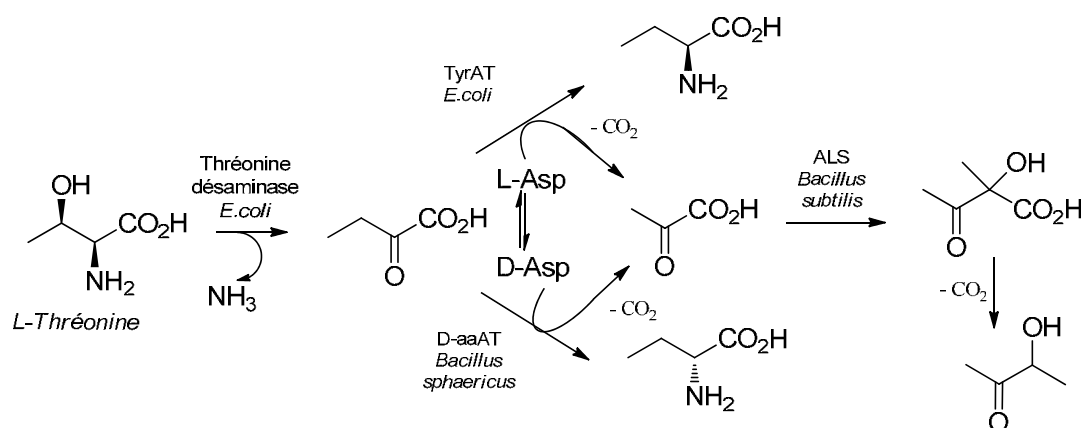


Schéma 37 : procédés biocatalytiques pour la synthèse des acides α -aminobutyriques.

¹⁶⁵ N. W. Fadnavis, S. H. Seo, J. H. Seo, B. G. Kim *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 2199-2202.

¹⁶⁶ D.J. Ager, I. Fotheringham, T. Li, D. Pantaleone *Enantiomer* **2000**, 5, 235-243.

¹⁶⁷ I. Fotheringham *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2209-2213.

¹⁶⁸ I. Fotheringham *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **2001**, 11, 199-205.

3.3.1.2 Utilisation de l'acide Glutamique en tant que donneur

Le Glu présente l'avantage d'être un substrat préférentiel pour la plupart des ATs. Son utilisation en quantité catalytique est possible via le couplage avec une deuxième réaction permettant de le régénérer.

3.3.1.2.1 Couplage avec l'AspAT

Dans ce cas, le Glu est régénéré à partir du KG par transamination en présence d'Asp. Comme nous l'avons vu précédemment, la décarboxylation de l'OA formé au cours de la réaction permet de déplacer l'équilibre de l'ensemble des réactions de transamination (schéma 38).¹⁶⁹

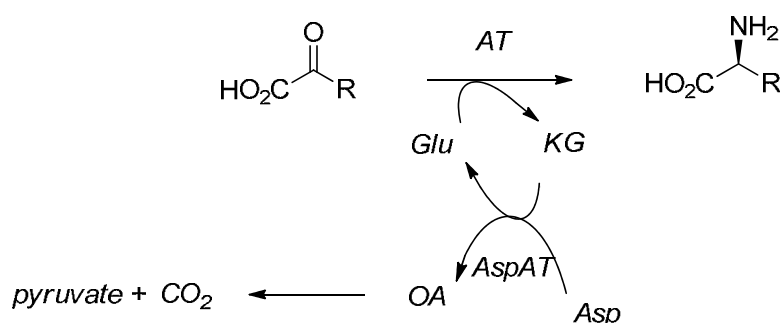


Schéma 38 : régénération du Glu par le couple Asp/AspAT.

Ce procédé a été utilisé avec plusieurs ATs différentes. On peut citer par exemple le couplage AspAT/GabaAT qui a été mis en œuvre pour la préparation de la L-phosphinothricine, un herbicide de contact largement utilisé et initialement commercialisé par la firme Hoechst sous le nom de Basta® (schéma 39).¹⁷⁰

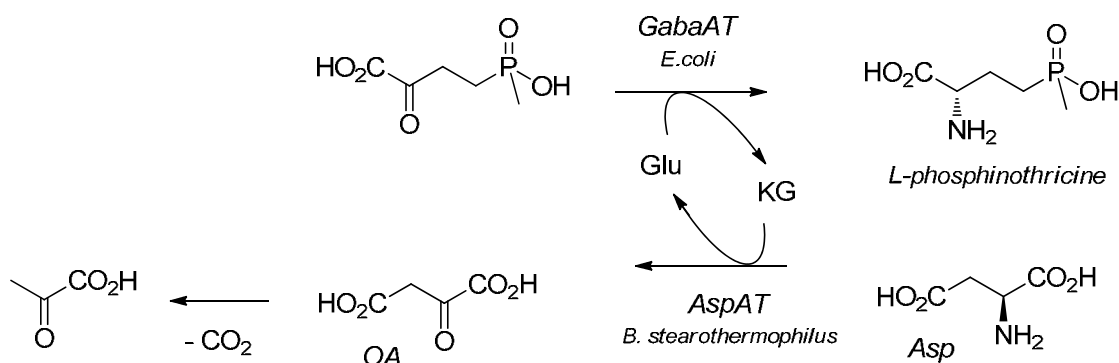


Schéma 39 : préparation de la L-phosphinothricine par transamination.

¹⁶⁹ J. D. Rozell, **1989**, US Patent 4826766.

¹⁷⁰ K. Bartsch, R. Schneider, A. Shultz *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 3794-3799.

3.3.1.2.2 Couplage avec la Glutamate Déshydrogénase (GluDH)

Le Glu est régénéré dans ce cas grâce à la GluDH en incorporant de l'ammoniac dans le milieu réactionnel. Cette réaction consomme le cofacteur NADH qui doit être à son tour régénéré si l'on souhaite mettre au point un procédé biocatalytique économiquement viable. Plusieurs exemples de cette approche ont été décrits et nous pouvons citer celui développé par Nakajima et al.¹⁷¹ pour la préparation d'acide aminé de la série D.

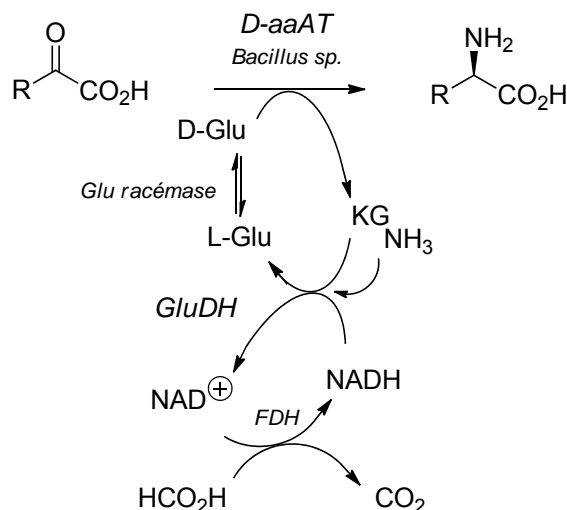


Schéma 40 : procédé biocatalytique pour la synthèse d'acides aminés de la série D.

Divers acides aminés ont ainsi été préparés avec des rendements supérieurs à 80 % en utilisant une D-aaAT d'origine bactérienne et une Glu racémase pour générer le D-Glu à partir du L-Glu. Ce dernier est régénéré par la GluDH à partir du KG. Le NAD^+ est, quant à lui, réduit par la formate déshydrogénase (FDH) avec conversion de l'acide formique en CO_2 , transformation irréversible assurant le déplacement global de l'équilibre.

3.3.1.2.3 Couplage avec l'AlanineAT (AlaAT)

Le Glu peut aussi être régénéré en présence de la L-Ala et de l'AlaAT. Dans le cas de la synthèse de la L-tert-Leucine décrite dans le schéma ci-dessous, la réaction met en jeu la BCAT et l'AlaAT.¹⁶⁷ Afin de déplacer l'équilibre, le pyruvate est ici décarboxylé sous l'action de la pyruvate décarboxylase (schéma 41).

¹⁷¹ N. Nakajima, K. Tanizawa, H. Tanaka, K. Soda *J. Biotechnol.* **1988**, 8, 243-248.

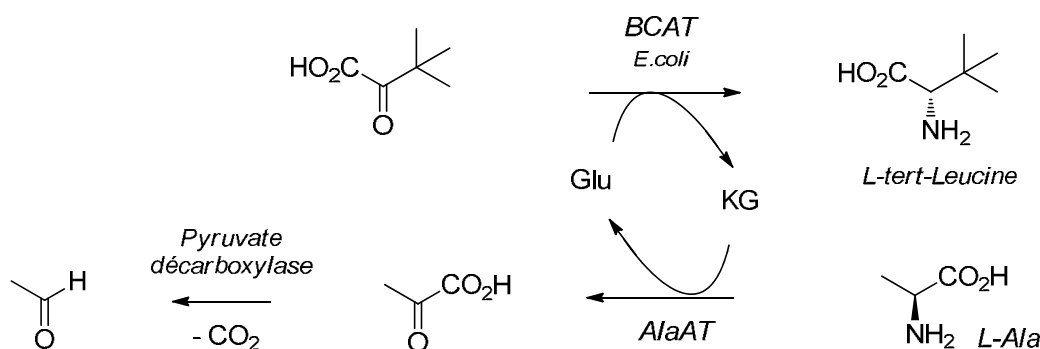


Schéma 41 : procédé multienzymatique de synthèse de la *L-tert-Leucine*.

3.3.1.2.4 Couplage avec l'ornithine AT (OrnAT)

L'OrnAT est une enzyme qui catalyse le transfert du groupe amino terminal de la chaîne latérale de l'ornithine. L'aldéhyde ainsi formé se cyclise spontanément, ce qui permet de déplacer l'équilibre de la réaction (schéma 42). La synthèse de la *L-tert-Leucine* et celle de l'acide *L-α-aminobutyrique* catalysées respectivement par la BCAT et la TyrAT sont de bons exemples pour illustrer ce procédé.¹⁷²

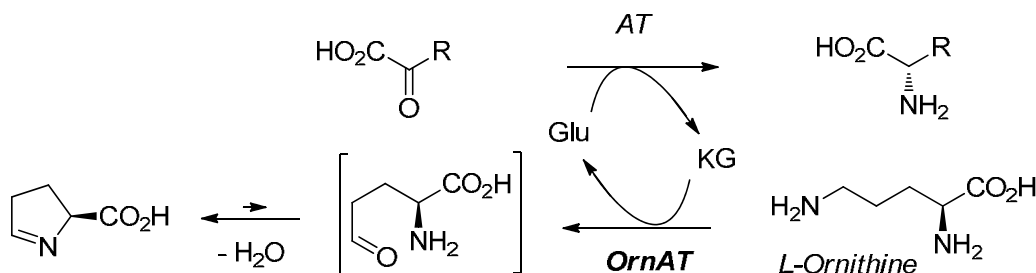


Schéma 42 : déplacement de l'équilibre en utilisant l'OrnAT.

3.3.1.3 Utilisation de l'Alanine (Ala) en tant que donneur

Comme dans le cas du Glu, l'Ala peut être utilisée en quantité catalytique en tant que donneur à condition que cet acide aminé soit substrat de l'AT utilisée. L'Ala qui est convertie en pyruvate après transamination, peut être facilement régénérée en utilisant l'Alanine Déshydrogénase (AlaDH). Ainsi, Galkin et al.¹⁷³ ont développé un procédé semblable à celui décrit par Nakajima¹⁶, mis à part que le Glu, la GluDH et la Glutamate racémase ont été remplacés par l'Ala, l'AlaDH et l'Alanine racémase. Cette méthode qui couple quatre enzymes permet la préparation d'une variété d'acides aminés de la série D. (schéma 43).

¹⁷² T. Li, A.B. Kostra, I.G. Fotheringham *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, 6, 533-538.

¹⁷³ A. Galkin, L. Kulakova, T. Yoshimura, K. Soda, N. Esaki *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 4651-4656.

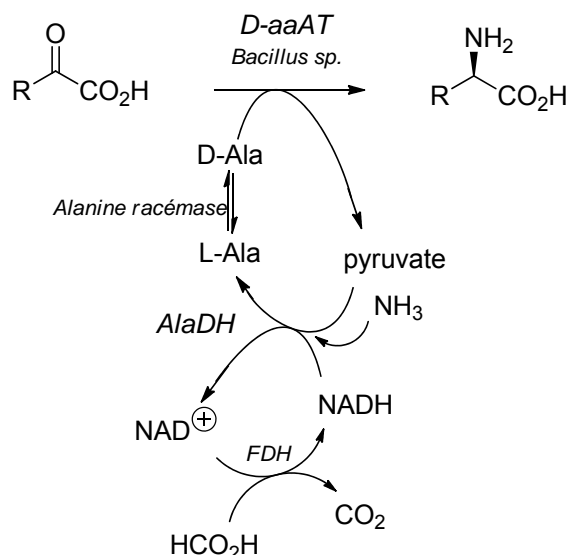


Schéma 43 : procédé multienzymatique pour la synthèse d'acides aminés de la série D.

Par ailleurs, le couplage de l'AlaAT avec des ω -ATs permet de préparer des α -aminoacides de la série L. Dans ce cas, l'Ala est régénérée par une ω -AT comme le montre le schéma ci-dessous. Le déplacement de l'équilibre est assuré par la formation favorable d'une cétone conjuguée. Cette réaction de régénération permet, en outre, d'effectuer le dédoublement cinétique de la 1-phényléthylamine (PEA) (**schéma 44**).¹⁷⁴

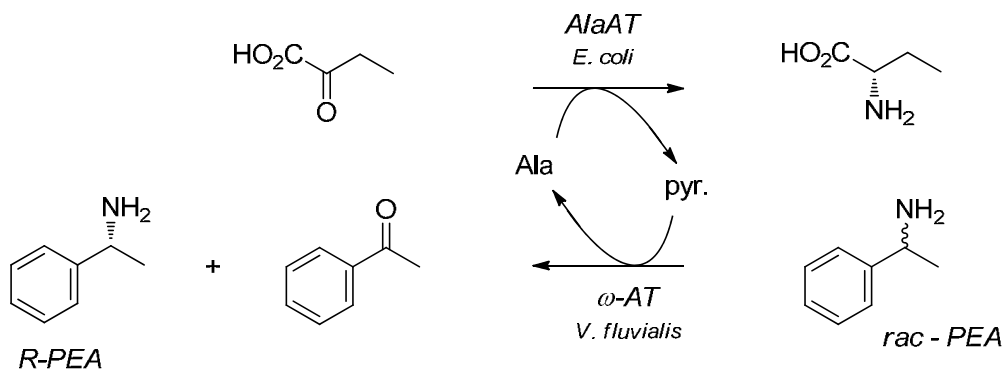


Schéma 44 : couplage de l'AlaAT et de l' ω -AT de *V. fluvialis*.

3.3.1.4 Utilisation de l'acide cystéine sulfinique (ACS) en tant que donneur

L'ACS est un analogue structural de l'Asp et constitue un substrat de l'AspAT. L'ACS est moins accessible que l'Asp. Il est cependant facilement préparé par oxydation de la cystine.¹⁷⁵ Il produit après transamination l'acide sulfinylpyruvique qui est instable et se décompose très rapidement en pyruvate et SO₂. Son utilisation en tant que donneur d'amine

¹⁷⁴ J-S Shin, B-G Kim *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 65, 206-211.

¹⁷⁵ R. Emiliozzi, L. Pichat, *Bull. Soc. Chim.Fr.* **1959**, 1887.

permet un déplacement d'équilibre de la transamination plus rapide qu'avec l'Asp. En effet, dans ce cas, aucune catalyse n'est nécessaire pour éliminer le cétoacide formé. La préparation du β -hydroxy-L-Asp¹⁷⁶ a été le premier exemple décrit d'utilisation de ce procédé (**schéma 46**).

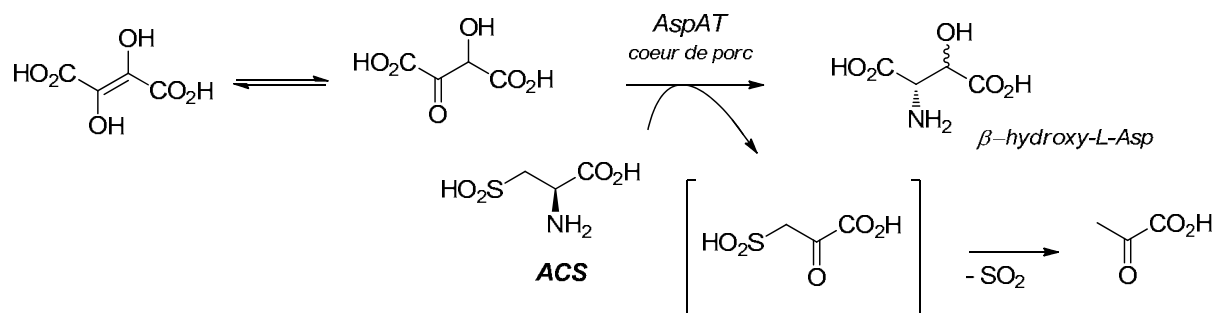


Schéma 46 : synthèse de l'acide β -hydroxy-L-Asp en utilisant l'AspAT et l'ACS en tant que donneur.

En 2006, un exemple de déracémisation de la 2-naphtylalanine (NAla) a été développé au laboratoire en couplant trois enzymes (**schéma 47**).¹⁷⁷ Une D-aminoacide oxydase (DAAO) convertit la D-NAla en naphtylpyruvate qui est transaminé en L-NAla par l'AspAT d'*E. coli*. en présence d'ACS (**schéma 47**). L'utilisation d'ACS en tant que donneur d'amine permet le déplacement d'équilibre de l'ensemble du procédé dans lequel la Catalase permet de régénérer l'oxygène en décomposant le peroxyde d'hydrogène produit au cours de la réaction d'oxydation.

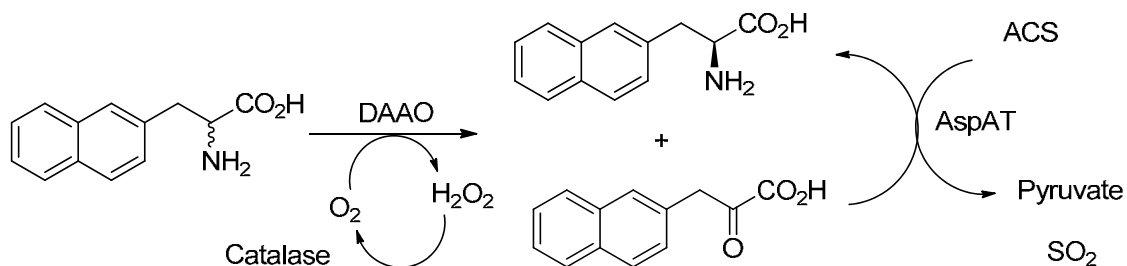


Schéma 47 : procédé multienzymatique de déracémisation de la 2-naphtylalanine.

Un autre avantage non négligeable de l'ACS est lié à son point isoélectrique qui est plus bas que celui de la plupart des aminoacides utilisés. L'ACS est donc facilement séparé des aminoacides produits par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Cette méthode de déplacement d'équilibre a été largement développée au laboratoire pour préparer des analogues du Glu comme nous le verrons dans la suite de ce rapport.

¹⁷⁶ W.T. Jenkins *Anal. Biochem.* **1979**, 93, 134-138.

¹⁷⁷ A. Caligiuri, P. Arrigo, T. Gefflaut, G. Molla, L. Pollegioni, E. Rosini, C. Rossi, S. Servi *Biotrans.* **2006**, 409-413.

3.3.2 Principales applications des ATs

3.3.2.1 α -Aminoacides protéinogènes

De nombreux travaux ont démontré l'intérêt des biotransformations pour la synthèse d'aminoacides naturels. Nombre d'entre-eux sont préparés par des procédés de fermentation à partir de sources de carbone et d'azote (glucose, éthanol, glycérol, ammoniac). Les acides aminés aromatiques constituent une exception et ne sont pas accessibles par des procédés simples de fermentation. Leur production par transamination à partir des cétoacides a fait l'objet de nombreux travaux. Ainsi, la L-Phe a été produite à partir de phénylpyruvate et d'Asp en utilisant différents biocatalyseurs : extraits cellulaires de cœur de porc¹⁷⁸, microorganismes sauvages^{179,180,181,182,183}, microorganismes recombinants surexprimant l'AspAT¹⁸⁴ ou la TyrAT d'*E. coli*.^{185,186,187}

La tyrosine a également été produite selon les mêmes procédés. La ¹⁵N-Tyr a été préparée avec la TyrAT d'*E.coli* en utilisant le ¹⁵N-Asp ou le ¹⁵N-Glu et un excès de p-hydroxyphénylpyruvate.¹⁸⁸ Cet exemple montre l'intérêt des ATs pour effectuer ce type de marquage isotopique

3.3.2.2 α -Aminoacides de la série D

Ce sont des produits rares qui présentent un important intérêt pour la préparation de peptides et de peptidomimétiques à visée thérapeutique. Plusieurs ATs spécifiques d'aminoacides de la série D ont été extraites de divers microorganismes (principalement de *Bacillus*), clonées et surexprimées chez *E. coli*. Ces ATs à large spectre de substrats ont été très utilisées pour la préparation de D-Ala, D-Asp, D-Leu, D-Met, D-Glu^{169, 171}, D-Phe, D-Tyr^{189, 190, 191} et D-2-aminobutyrate.¹⁶⁴

¹⁷⁸ S. Sakurai, *Biochemistry* **1956**, 43, 851-855.

¹⁷⁹ J.F. Walter, **1985**, *UK Patent* 215250.

¹⁸⁰ J.F. Walter, M.B. Sherwin, **1986**, *UK Patent* 2161159.

¹⁸¹ J.F. Walter, M.B. Sherwin, **1989**, *US Patent* 4859591.

¹⁸² L.L. Wood, G.J. Calton, **1986**, *US Patent* 4600612.

¹⁸³ L.L. Wood, G.J. Calton, **1987**, *US Patent* 4710467.

¹⁸⁴ D.J. Lewis, S.G. Farrand, **1985**, *European Patent* 0152275.

¹⁸⁵ R. Marquardt, J. Then, H-M. Degger, G. Wohner, M.K. Robinson, A. Doherty, **1992**, *US Patent* 5091314.

¹⁸⁶ Y-P. Chao, Z.J. Lai, P. Chen, Z-T. Chern *Biotechnol. Prog.* **1999**, 15, 453-458.

¹⁸⁷ B.K. Cho, H.J. Cho, H. Yun, B-G. Kim *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **2003**, 26, 273-285.

¹⁸⁸ J. A. Zintel, **1973**, *CA Patent* 934313.

¹⁸⁹ I. Fotheringham, V. Hills, **1996**, *European Patent* 736604.

¹⁹⁰ I. Fotheringham, P.P. Taylor, J.L. Ton, **1998**, *US Patent* 5728555.

¹⁹¹ H-S. Bae, S-G Lee, M-S. Kwak, K. Soda, M-H. Sung *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1999**, 6, 241-247.

De plus, des D-aminoacides peuvent être obtenus à partir de mélanges racémiques en utilisant une AT spécifique des L-aminoacides. Dans ce cas, seul l'énantiomère L du mélange racémique de l'aminoacide subit la transamination catalysée par l'AT. Nous pouvons ainsi citer comme exemple le dédoublement cinétique d'analogues hétéroaromatiques de la phénylalanine réalisé en présence de la L-TyrAT d'*E.coli* (**schéma 48**).¹⁹²

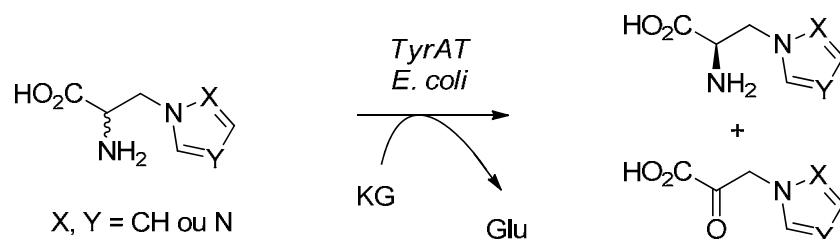


Schéma 48 : dédoublement cinétique d'aminoacides aromatiques catalysé par la TyrAT.

D'autre part, par analogie avec la synthèse de la NAla vue précédemment¹⁷⁵, les D-aminoacides peuvent aussi être préparés à partir du mélange racémique en utilisant dans ce cas une L-désaminase de *Proteus mirabilis*, surexprimée dans une souche d'*E.coli* et une D-transaminase. Ce couplage a permis de préparer l'isomère D d'un analogue de la phénylalanine avec un rendement de 68% et un excès énantiomérique supérieur à 99 % (**schéma 49**).¹⁹³

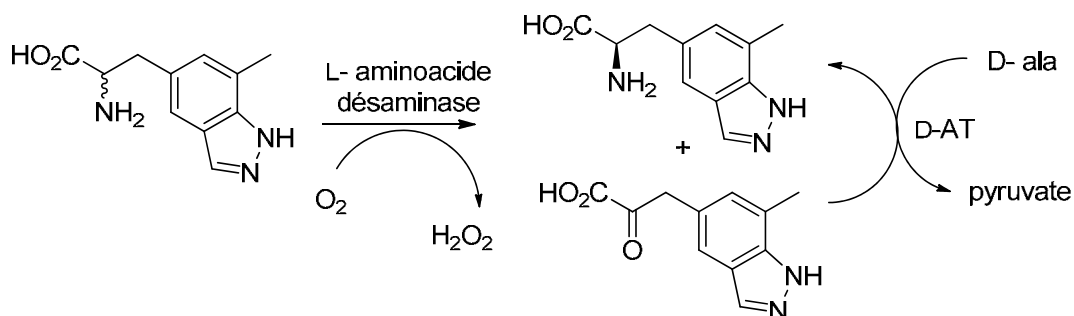


Schéma 49 : procédé multienzymatique pour la déracémisation d'un aminoacide aromatique.

Ce composé peut aussi être préparé efficacement avec un rendement de 92% et un excès énantiomérique supérieur à 99 % en utilisant une D-AT de *Bacillus thuringiensis*, surexprimée dans une souche d'*E.coli* (**schéma 50**).¹⁹¹

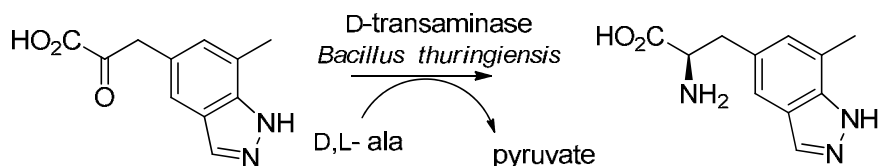


Schéma 50 : synthèse d'un acide aminé aromatique avec une D-AT de *Bacillus thuringiensis*.

¹⁹² B.K. Cho, H-Y. Park, J-H. Seo, K. Kinnera, B-S. Lee, B-G. Kim *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 88, 512-519.

¹⁹³ R. L. Hanson, R. N. Patel *Org. Proc. Res. Dev.* **2008**, 12, 1119-1129.

3.3.2.3 α -Aminoacides rares ou non naturels de la série L

La L-Homophénylalanine (HPA) est présente dans la structure de pseudopeptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et utilisés pour le traitement de l'hypertension artérielle (enalapril, lisinopril...). La préparation de l'HPA par transamination enzymatique a suscité de nombreuses études. L'AspAT d'*E.coli* a été utilisée avec l'Asp comme aminoacide donneur et l'OA décarboxylase pour déplacer l'équilibre de transamination.¹⁶² Par ailleurs un mutant de l'AspAT d'*E. coli* (R292E, L18H) s'est montré actif vis-à-vis de la L-HPA et de la L-Lys. Un procédé a été mis au point en profitant de la cyclisation spontanée du cétoacide formé à partir de la Lys et de la faible solubilité de la L-HPA (précipitation dans le milieu) pour déplacer l'équilibre de transamination (**schéma 51**).¹⁹⁴

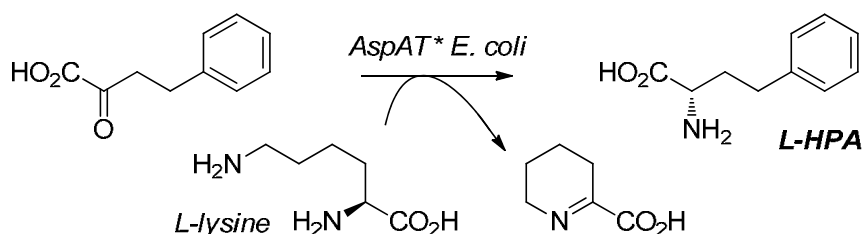


Schéma 51 : synthèse de la L-HPA avec un mutant de l'AspAT d'*E.coli*.

Le même groupe a récemment utilisé la même stratégie, mais en utilisant cette fois la lysine protégée en bout de chaîne. Cette méthode donne accès à la L-HPA ainsi qu'à l'acide 2-oxo-6-amino-hexanoïque protégé (OAHA) (**schéma 52**).¹⁹⁵ Ce dernier est aussi un important précurseur dans la synthèse d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (lisinopril, lonapril).

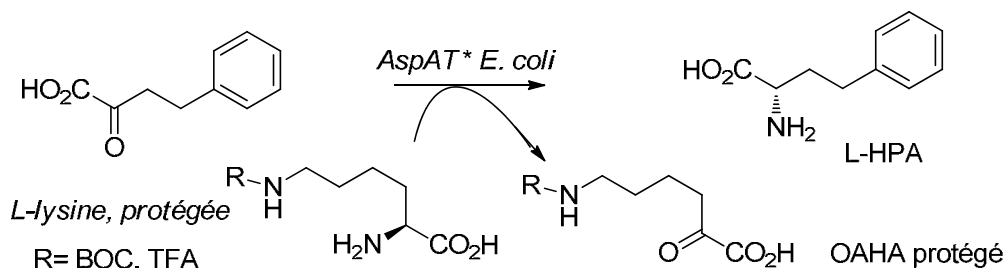


Schéma 52 : synthèse de la L-HPA et du OAHA protégé.

¹⁹⁴ H-H. Lo, S-K. Hsu, W. D. Lin, N-L. Chan, W-H. Hsu *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 411-415.

¹⁹⁵ H.-H. Lo, W.-D. Lin, S.-K. Hsu, W.-H. Hsu *Biotechnol. Prog.* **2009**, 25, 1637-1642.

La phosphinothricine (PPT, également dénommée glufosinate) est le principe actif d'un herbicide non sélectif initialement développé par la firme Hoechst et commercialisé sous le nom de Basta. Bien que la forme commerciale corresponde au mélange racémique, seul l'énantiomère L possède les propriétés herbicides liées à l'inhibition de la glutamine synthase. Plusieurs travaux ont donc concernés la synthèse stéréosélective de la L-PPT par transamination. Une AT isolée d'une souche d'*E. coli* présente une activité PPT-transaminase. Identifiée comme étant une GabaAT (EC 2.6.1.19), cette enzyme, sous une forme immobilisée a permis de préparer la L-PPT en utilisant le Glu comme donneur.¹⁹⁶ Le procédé a été amélioré par la suite en associant l'enzyme à un système de régénération du Glu mettant en jeu une AspAT thermostable et en utilisant l'Asp comme donneur primaire d'amine.¹⁶⁸ D'autres microorganismes sauvages ont, par la suite, été sélectionnés et utilisés pour préparer la L-PPT.^{197,198}

La **L-tert-Leucine** tout comme la L-homophénylalanine, présente un intérêt pour la synthèse de peptidomimétiques possédant des potentialités thérapeutiques. La synthèse de cet aminoacide par transamination a ainsi fait l'objet de plusieurs publications. Des souches d'*E. coli* recombinantes surexprimant la BCAT et la TyrAT ont été utilisées avec l'Asp comme donneur.¹⁹⁴ D'autres souches d'*E. coli* très efficaces ont été obtenues par évolution dirigées:¹⁹⁹ après mutagenèse aléatoire induite par de fortes concentrations en nitrites, les souches d'*E. coli* ont été sélectionnées par culture dans un milieu où la L-tert-Leu constitue la seule source d'azote. Les souches ainsi sélectionnées ont une activité accrue vis-à-vis des aminoacides hydrophobes et aromatiques et présentent vraisemblablement des mutations au niveau des gènes *ilvE* et *tyrB* codant respectivement pour la BCAT et la TyrAT.

Autres aminoacides non protéogènes : Des microorganismes comme *N. diaphanozonaria* ou *Sinorhizobium. meliloti*, ont été identifiés pour déracémiser plusieurs aminoacides comme la phénylalanine (Phe), la 4-Chloro-Phe, la Phénylglycine ou encore l'acide aminoheptanoïque²⁰⁰ (**schéma 53**). Le procédé d'inversion de configuration est dû à la combinaison de deux réactions enzymatiques au sein du même microorganisme: une oxydation de l'isomère D conduit au cétoacide qui est ensuite converti en L- aminoacide sous l'action d'une transaminase.

¹⁹⁶ A. Schulz, P. Taggeselle, D. Tripier, K. Bartsch *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, 56, 1-6.

¹⁹⁷ J. Then, K. Bartsch, H-M. Deger, S. Grabley, R. Marquardt, **1999**, *US Patent* 5919669 et 5962281.

¹⁹⁸ K. Bartsch, **2000**, *WO Patent* 0066760.

¹⁹⁹ P.C. Engel, **2000**, *WO Patent* 0037631.

²⁰⁰ D. I. Kato, K. Miyamoto, H. Ohta *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, 157-165.

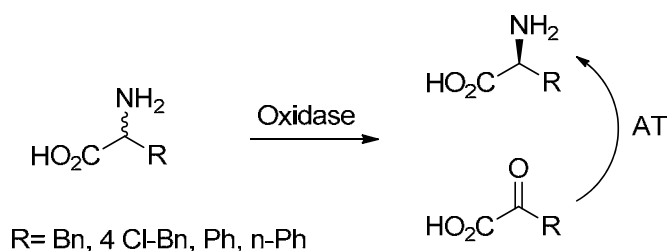


Schéma 53 : déracémisation microbiologique d'acides aminés.

Le même groupe a par la suite cloné et surexprimé le gène de la BCAT de *Sinorhizobium meliloti* chez *E.coli* qui exprime par ailleurs l'enzyme endogène DadA (D-aminoacide deshydrogénase) responsable de l'étape d'oxydation et inductible par addition d'Ala au milieu de culture. Cette souche recombinante est très efficace pour déracémiser la L-4-Chloro-Phe.²⁰¹

Récemment Kim et coll ont décrit la synthèse de l'acide 2-aminobutyrique en utilisant l' ω -AT isolée de *Vibrio fluvialis* JS17 et la benzylamine comme donneur d'amine.²⁰² Une extraction biphasique permet d'éliminer le benzaldéhyde du milieu ce qui évite l'inhibition de l'enzyme (**schéma 54**).

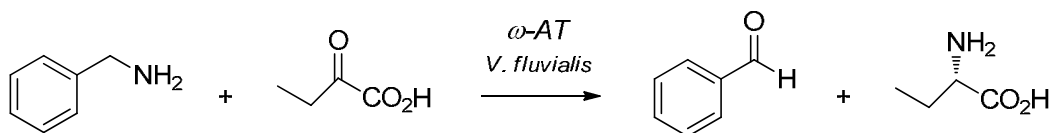


Schéma 54 : synthèse de l'acide L-2-aminobutyrique.

De nombreux autres acides aminés non naturels ont été préparés par transamination enzymatique et sont regroupés dans le tableau 6.

²⁰¹ D. Kato, K. Miyamoto, H. Ohta, *Biocat. Biotrans.* **2005**, 23, 375-379.

²⁰² J.-S. Shin, B.-G. Kim *Biotechnol. Lett.* **2009**, 31, 1595-1599.

L-aminoacide	Biocatalyseur	Aminoacide donneur	Référence bibliographique
	Cellules entières ou extraits cellulaires de divers microorganismes (Bactéries, levures, champignons)	Glu (2eq.) et Asp (2eq.)	(Nagasaki, 1973) ²⁰³
	AspAT d' <i>E.coli</i>	Asp	(Baldwin, 1987) ²⁰⁴
	AspAT d' <i>E.coli</i>	Asp	(Baldwin, 1987) ²⁰⁵
	Souche d' <i>E. coli</i> surexprimant AT hyperthermostable de <i>Thermococcus profundus</i>	Glu (2eq.)	(Caligiuri, 2006) ¹⁰⁴
	Cellules d' <i>E. coli</i> surexprimant la TyrAT	Asp	(Hanzawa, 2001) ²⁰⁶
	Extraits cellulaires de <i>Pseudomonas sp.</i> et <i>Bacillus sp.</i>	Ala et Glu	(Meiwes, 1997) ²⁰⁷
	Cellules d' <i>E. coli</i> surexprimant la TyrAT Cellules d' <i>E. coli</i> surexprimant la L-AlaAT	Asp Ala	(Cameron, 2001) ²⁰⁸
	AspAT de cœur de porc	ACS	(Fotheringham, 2001) ⁹⁴ (Cho, 2003) ²⁰⁹
	AspAT de cœur de porc	ACS	(Jenkins, 1979) ¹⁰³
	AspAT de cœur de porc et d' <i>E.coli</i>	ACS	(Passerat, 1987) ²¹⁰ (Echalier, 1993) ²¹¹ (Hélaine, 1999) ²¹²
	AspAT de cœur de porc	ACS	(Alaux, 2005) ⁹⁷
	AspAT de cœur de porc	ACS	(Hélaine, 2001) ²¹³
	AspAT de cœur de porc	ACS	(Faure, 2006) ⁹⁹
	BCAT d' <i>E.coli</i>	ACS	(Xian, 2007) ²¹⁴
	AspAT d' <i>E.coli</i>	ACS	(Sagot, 2008) ^{44, 98}

Tableau 6 : L-α-aminoacides non naturels préparés par transamination enzymatique.

- ²⁰³ T. Nagasaki, M. Sugita, K. Nakagawa, H. Koyama, **1973**, *US Patent* 3767528.
- ²⁰⁴ J.E. Baldwin, R.L. Dyer, C.N. Si, A.J. Pratt, M.A. Russell *Tetrahedron Lett.* **1987**, 32, 3745-3746.
- ²⁰⁵ J. E. Baldwin *Tetrahedron Lett.* **1987**, 32, 3745-3746.
- ²⁰⁶ S. Hanzana *Biotech. Lett.* **2001**, 23, 589-591.
- ²⁰⁷ J. Meiwes, M. Shudok, G. Kretschmar *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 527-536.
- ²⁰⁸ M. Cameron, D. Cohen, I.F. Cottrell, C. Roberge, M. Chartrain *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, 14, 1-5.
- ²⁰⁹ B-K. Cho, H. Yun, B6G. Kim *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 81, 783-789.
- ²¹⁰ N. Passerat, J. Bolte *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1277-1280.
- ²¹¹ F. Echalier, O. Constant, J. Bolte *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2747-2750.
- ²¹² V. Hélaine, J. Rossi, J. Bolte *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6577-6580.
- ²¹³ V. Hélaine, J. Rossi, T. Gefflaut, S. Alaux, J. Bolte *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 693-697.
- ²¹⁴ M. Xian, S. Alaux, E. Sagot, T. Gefflaut *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 7560-7566.

3.3.2.4 Synthèse d'amines chirales

Depuis une dizaine d'année, de nombreux travaux ont concerné l'utilisation des ω -ATs pour l'obtention d'amines chirales. En effet, ces enzymes ont la particularité d'admettre comme substrats, des dérivés carbonylés qui ne comportent pas de carboxylate en α . Plusieurs enzymes de cette classe ont été récemment découvertes en mettant en œuvre des tests de sélection qui consistent à faire croître des microorganismes issus de l'environnement avec, comme seule source d'azote, l'amine pour laquelle une activité est recherchée. Ainsi c'est en mettant dans le milieu de culture la (*S*)-1-phényléthylamine (S-PEA) que le microorganisme *Vibrio fluvialis* a été identifié pour son activité ω -AT caractérisée par une forte énantiosélectivité et une bonne résistance à l'inhibition par excès de substrat.²¹⁵ L' ω -AT de *Vibrio fluvialis* a donc permis la préparation de la (*S*)-1-phényléthylamine ainsi que le dédoublement cinétique de diverses amines chirales (schéma 55).^{216,217,218} Dans ce cas, l'accepteur d'amine est le pyruvate et le déplacement d'équilibre est généralement assuré par la formation favorable de cétones conjuguées.

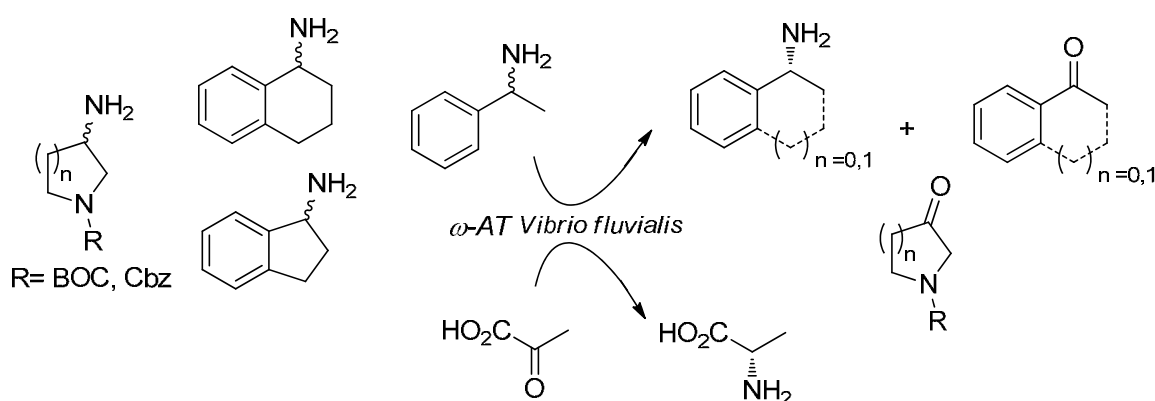


Schéma 55 : dédoublement cinétique d'amines chirales catalysé par l' ω -AT de *Vibrio fluvialis*.

D'autres part, les amines chirales peuvent aussi être préparées à partir des cétoacides correspondant en présence de l' ω -AT et utilisant l'Ala comme donneur d'amine (schéma 56).

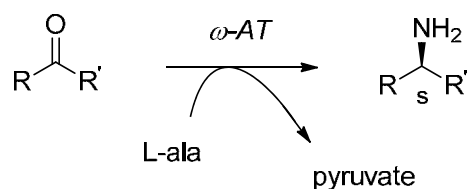


Schéma 56 : synthèse asymétrique catalysée par une ω -AT.

²¹⁵ J.S. Shin, B-G. Kim, *Bios. Biotech. Biochem.* **2001**, 65, 1782-1788;

²¹⁶ D. Koszelewski, K. Faber; W. Kroutil *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 63, 39-44.

²¹⁷ M. D. Truppo, N. J. Turner, J. D. Rozzell *Chem. Commun.* **2009**, 2127-2129.

²¹⁸ M. Höhne, K. Robins, Uwe T. Bornscheuer *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 807-812.

Le déplacement d'équilibre a été réalisé par plusieurs méthodes. Koszelewski et al²¹⁹ ont utilisé l'alanine déshydrogénase pour recycler l'alanine (**schéma 57**). La Glucose deshydrogénase (GDH) ou la formate deshydrogénase (FDH) permettent de régénérer le NADPH utilisé comme cofacteur.

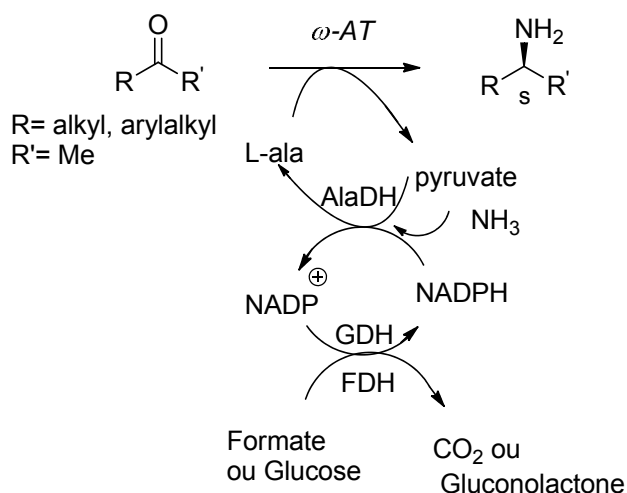


Schéma 57 : procédé multienzymatique pour préparer des amines chirales avec l'ω-AT.

Le même groupe a montré que la combinaison d'un dédoublement cinétique catalysé par une D-ω-AT suivi d'une amination stéréosélective catalysée par une L-ω-AT permet de préparer de nombreuses amines chirales avec des rendements quantitatifs et d'excellents excès énantiomériques (**schéma 58**).²²⁰ Ainsi le cétoacide formé au cours de la première étape à partir de l'amine (R) est converti en amine (S) au cours de la deuxième étape en utilisant l'Ala comme donneur.

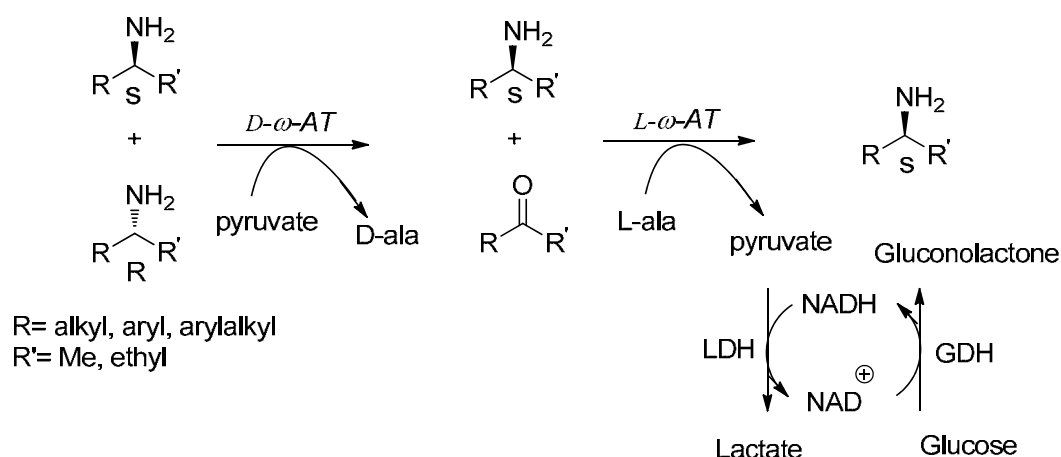


Schéma 58 : déracémisation d'amines par combinaison de 2 ω-AT.

²¹⁹ D. Koszelewski, D. Rozzell, W. Kroutil *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9337-9340.

²²⁰ D. Koszelewski, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 2289-2292.

D'autre part Kim et coll.²²¹ ont construit une souche d'*E.coli* coexprimant un ω -AT et une acétolactate synthase (ALS) pour préparer la (*S*)-1-phenyléthylamine (*S*-PEA) (**schéma 59**). Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'ALS permet de convertir le pyruvate en acétoïne et d'assurer le déplacement d'équilibre.

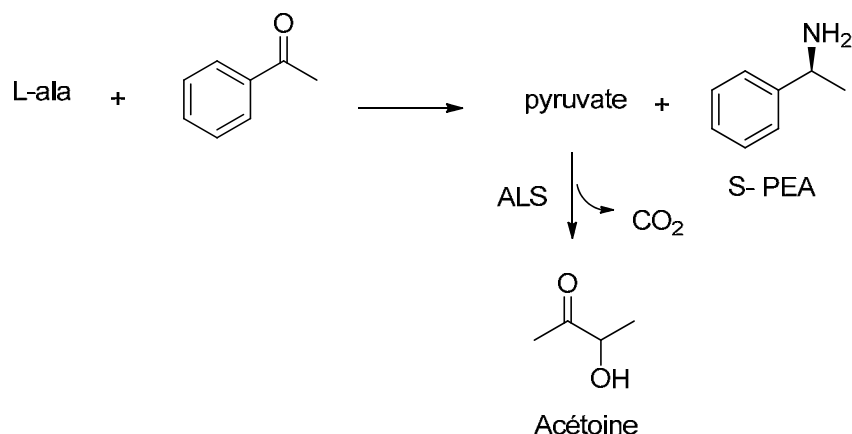


Schéma 59 : couplage entre une ω -AT et une acétolactate synthase.

Höhne et coll.²²² ont utilisé quant à eux une pyruvate decarboxylase (PDC) qui décompose le pyruvate en acétaldéhyde et en CO_2 (**schéma 60**). Ces deux dernières méthodes ne nécessitent pas de recyclage de cofacteur et dans le dernier, les produits de la réaction de décarboxylation sont volatils.

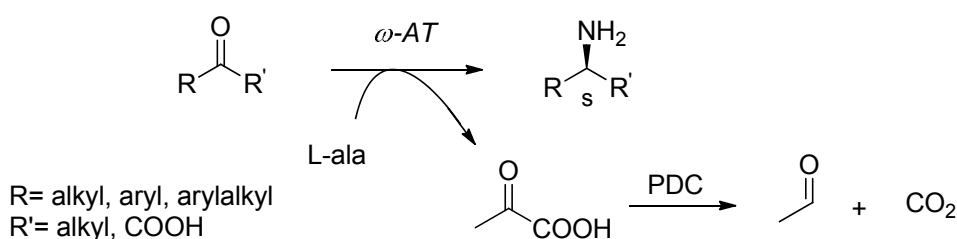


Schéma 60 : couplage entre une ω -AT et de la pyruvate décarboxylase.

D'autres travaux ont été orientés vers la découverte d'enzymes efficaces pour préparer des β -aminoacides: la sélection de microorganismes sauvages avec l'acide (*S*)-3-aminobutyrique a permis d'identifier une nouvelle ω -AT chez *Alcaligenes denitrificans*.²²³. Cette enzyme possède un large spectre de substrat et elle est, comme les précédentes, active vis-à-vis de la PEA. La recherche de nouvelles activités β -AT a également été entreprise par

²²¹ H. Yun, B.-G. Kim *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, 72, 3030-3033.

²²² M. Höhne, S. Köhl, K. Robins, U. T. Bornscheuer *ChemBioChem* **2008**, 9, 363-365.

²²³ H. Yun, B.-K. Cho, B.-G. Kim *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 87, 772-778.

évolution dirigée de l' ω -AT de *V. fluvialis* :²²⁴ le gène codant pour l' ω -AT a été muté de façon aléatoire par la technique « d'error prone PCR » et la collection de gènes mutés obtenue a été exprimée chez *E.coli*. Les clones ont été sélectionnés avec un milieu de culture contenant l'acide 3-amino-3-phénylpropanoïque (β -phénylalanine) comme seule source d'azote. Des premiers résultats modestes ont été obtenus par cette approche : des enzymes possédant une activité β -PheAT accrue par un facteur 3 (par rapport à l'enzyme sauvage) ont été identifiées. En 2007, Kim et al.²²⁵ ont décrit une nouvelle β transaminase clonée chez *Mesorhizobium sp.* qui présente une importante activité pour les acides β -aminocarboxyliques. Ainsi, l'acide (*S*)-3-Amino-3-phénylpropionique a été produit à partir du β -cétoacide correspondant, lui-même obtenu par hydrolyse du β -cétoester catalysée par une lipase (schéma 61).

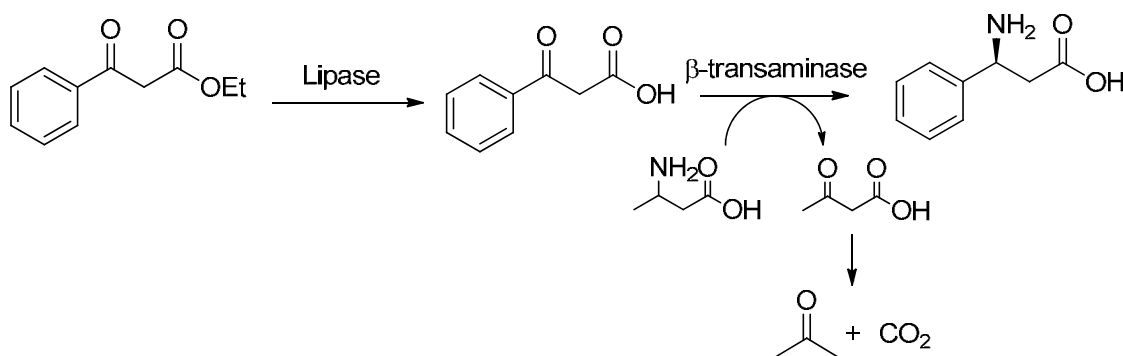


Schéma 61 : préparation de l'acide (*S*)-3-amino-3-phénylpropionique par transamination.

Il est également intéressant de mentionner que la combinaison d'une transcétolase (TK) d'*E.coli* et d'une β -alanine:pyruvate transaminase (β -APAT) isolée de *Pseudomonas aeruginosa* permet la préparation d'aminoalcools chiraux. Ainsi le 2-amino-1,3,4-butanetriol (ABT), un important synthon précurseur de nombreuses molécules d'intérêt pharmaceutique, a été préparé à partir de composés non chiraux en utilisant un microorganisme recombinant d'*E.coli* exprimant à la fois la TK et la β -APAT (schéma 62). La TK permet de condenser le fragment hydroxyacétyle de l'hydroxypyruvate sur le glycolaldéhyde pour former l'érythrulose. Ce dernier est converti en ABT en présence de L-1-phenylethylamine (PEA) au cours de la réaction catalysée par la β -APAT. Le rendement se limite cependant à 21 % en raison de la décomposition de l'ABT en présence de l'extrait cellulaire.²²⁶

²²⁴ B.-Y. Hwang, B.-G. Kim *Enz. Microbiol. Technol.* **2004**, 34, 429-436.

²²⁵ J. Kim, D. Kyung, H. Yun, B. K. Cho, J. H. Seo, M. Cha, B. Kim *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 1772-1782.

²²⁶ C. U. Ingram, M. Bommer, P. A. Dalby, J. M. Ward, G. J. Lye *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, 96, 559-569.

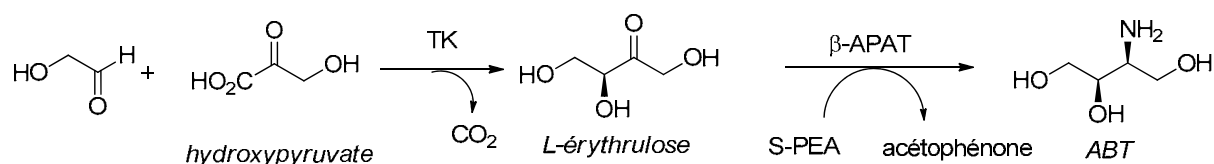


Schéma 62 : préparation de l'ABT par un procédé biocatalytique.

Récemment le (2*S*,3*S*)-2-aminopentane-1,3-diol a été synthétisé selon la même stratégie.²²⁷ Un mutant de la TK d'*E.coli* (D469T) a permis la synthèse de la (3*S*)-1,3-dihydroxypentane-2-one à partir du propanal et de l'hydroxypyruvate. L' ω -AT de *Chromobacterium violaceum* (DSM30191) transforme ensuite cet intermédiaire en (2*S*,3*S*)-2-aminopentane-1,3-diol en présence d'isopropylamine comme donneur d'amine (**schéma 63**).

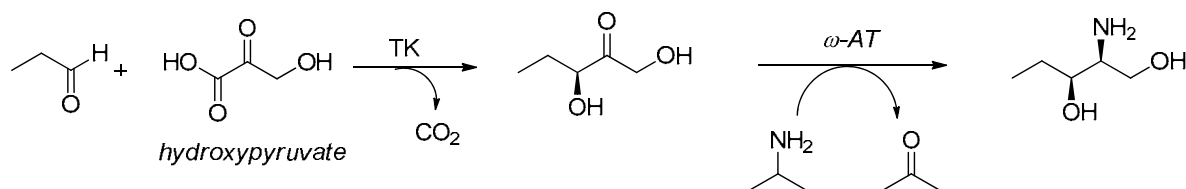


schéma 63 : procédé multienzymatique de synthèse du (2*S*,3*S*)-2-aminopentane-1,3-diol.

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons dire que les ATs constituent des outils efficaces pour la synthèse d'un grand nombre d'amines et d'acides aminés chiraux. L'utilisation de ces enzymes représente une alternative très intéressante aux méthodes conventionnelles de synthèse organique.

²²⁷ M. E. B. Smith P. A. Dalby, H. C. Hailes, G. J. Lye, J. M. Ward, J. M. Woodley, M. Micheletti *Org. Proc. Res. Dev.* **2009**, 14, 99-107.

Chapitre 4 Travaux et résultats antérieurs

4.1 Synthèse d'analogues du Glu

Comme nous l'avons mentionné dans les chapitres précédents, la synthèse d'analogues de l'acide 2-oxoglutarique (KG) et leur conversion en analogues du Glu par transamination enzymatique est un sujet développé au laboratoire de longue date. Cette approche a permis de préparer des analogues du Glu substitués en position 3 et/ou 4 de façon hautement stéréosélective.

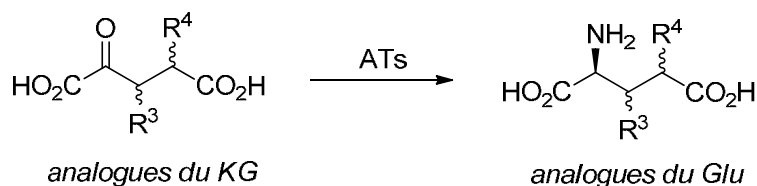


Schéma 64 : synthèse générale des analogues du Glu par transamination.

Cette stratégie de synthèse n'est efficace que si on l'accède facilement aux analogues du KG. Ainsi, de nombreux efforts ont été faits au cours de ces 10 dernières années pour développer des méthodes de synthèse, simples et générales, pour la préparation des analogues du KG. Ces travaux ont fait l'objet de trois thèses (V. Helaine, 1995-1999, S. Alaux, 1999-2002 et E. Sagot 2004-2007). Un stage post-doctoral (Mo Xian, 2003-2004) a par ailleurs porté sur l'étude de la BCAT pour la synthèse d'analogues du Glu.

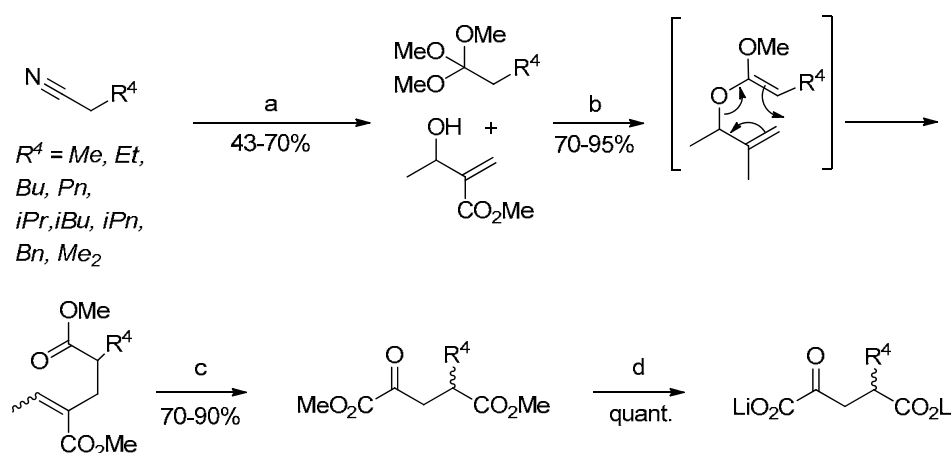
Cette partie est consacrée aux travaux antérieurs à cette thèse, effectués au laboratoire et présente les différentes méthodes mises au point pour la synthèse des analogues du KG, les études de spécificité de substrat de l'AspAT et de la BCAT, les analogues du Glu qui ont été préparés ainsi que les activités de ces molécules vis-à-vis de certains acteurs du système glutamatergique.

4.1.1 Préparation des analogues du KG

Les analogues du KG ont été préparés selon 4 voies principales développées au laboratoire.

4.1.1.1 Réarrangement de Claisen-Johnson

Cette méthode a été mise au point par V. Hélaïne et S. Alaux pour préparer une série d'analogues alkylés en position 4. Cette méthode est basée sur la condensation de l' α -hydroxyéthylacrylate sur un orthoester. L'acétal de cétène produit se réarrange pour former un 2-éthylidène-glutarate. Ce dernier subit ensuite une coupure oxydante qui peut se faire soit par ozonolyse à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, soit en présence de RuO_2 et NaIO_4 à température ambiante. Enfin, la saponification du cétoester s'effectue facilement en présence d'une quantité stœchiométrique de LiOH en solution diluée (**schéma 65**).



Réactifs et conditions : (a) i : MeOH , HCl , 0°C ; ii : MeOH , cyclohexane, reflux ; (b) EtCO_2H , PhCH_3 , reflux ; (c) NaIO_4 , RuO_2 , H_2O , CCl_4 , CH_3CN ou O_3 , CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis Me_2S ; (d) LiOH , H_2O , THF ou MeOH .

Schéma 65 : synthèse de 4-alkylKG

Cette méthode a permis la préparation des mélanges racémiques des 4-méthyl, éthyl et propyl-KG²¹⁰, ainsi que des 4-butyl, isobutyl, isopropyl, pentyl, isopentyl, benzyl et diméthyl-KG⁹⁷ avec des rendements globaux satisfaisants. Les orthoesters utilisés sont soit commerciaux, soit préparés à partir des nitriles correspondants selon la méthode de Pinner.²²⁸ L' α -hydroxyméthylacrylate est, quant à lui, facilement accessible, via de la condensation de Baylis-Hillman entre l'acrylate de méthyle et l'acétaldéhyde en présence du catalyseur nucléophile DABCO (diazabicyclo[2.2.2]octane), (**schéma 66**).



Schéma 66 : synthèse de l' α -hydrométhylacrylate de méthyle par condensation de Baylis-Hillman

²²⁸ A. Pinner, *Ber.* **1883**, 16, 1643-1665.

Les analogues substitués en position 3 sont également accessibles par cette stratégie à partir d'un α -hydroxyméthylacrylate substitué en β . Cependant, ce dernier ne peut être obtenu directement par la condensation de Baylis-Hillman, qui est inefficace avec les acrylates substitués. Le dérivé 3-phényl-KG a cependant pu être préparé à partir du 2-hydroxyméthyl cinnamate de méthyle lui-même obtenu par un réarrangement favorable du produit de condensation de Baylis-Hillman entre l'acrylate de méthyle et le benzaldéhyde.

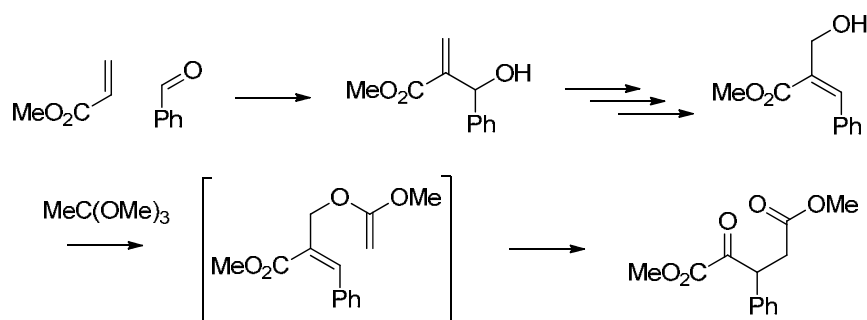


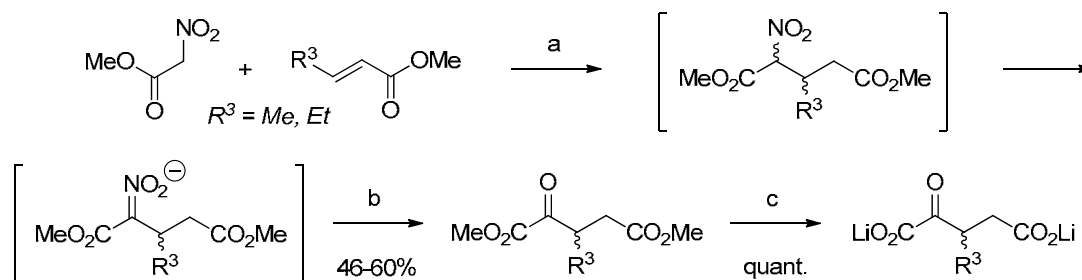
Schéma 67 : synthèse du 3-Ph-KG.

Cependant cet enchaînement réactionnel n'est pas bien adapté à la synthèse d'autres analogues alkylés en position 3. La méthode développée par la suite a permis, quant à elle, d'accéder plus facilement à ces dérivés.

4.1.1.2 Utilisation de la condensation de Michael

4.1.1.2.1 Utilisation d'un nitroacétate

Une première méthode simple et efficace est basée sur la condensation de Michael d'un nitroacétate sur un acrylate substitué. Cette méthode a permis de préparer les 3-méthyl et 3-éthyl-KG. En effet le produit de la condensation de Michael peut être converti en nitronate en présence d'une base et ensuite ozonolysé pour former le cétoester correspondant (**schéma 68**). Les rendements globaux obtenus vont de 46 à 60 %. Cette méthode a malheureusement été abandonnée car les esters de l'acide nitroacétique sont des produits fortement irritants et allergènes.

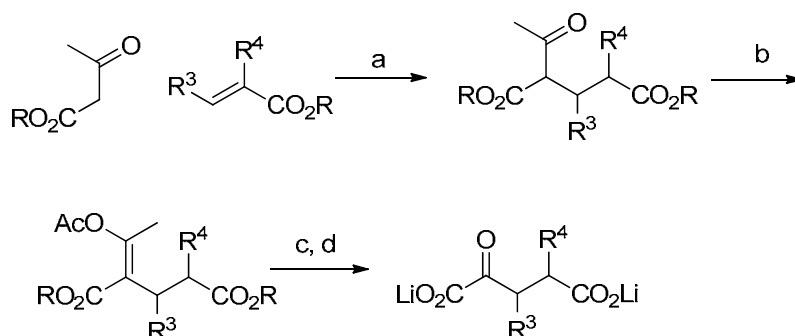


Réactifs et conditions : (a) Triton B, MeOH, 60°C ; (b) O₃, MeOH puis Me₂S ; (c) LiOH, H₂O, THF

Schéma 68 : synthèse de 3-alkyl-KG via de la réaction de Michael.

4.1.1.2.2 Utilisation d'un acétoacétate et ozonolyse d'acétates d'énol

Une stratégie voisine a été développée en remplaçant le nitroacétate par un acétoacétate. Ainsi, après condensation sur un acrylate substitué, il se forme un β -cétoester que l'on peut facilement convertir en acétate d'énol.²¹² Après ozonolyse et saponification des esters, on obtient un analogue du KG substitué en position 3 et/ou 4 (**schéma 69**).



Conditions : (a) KF, MeOH ou DMSO; (b) pyridine, AcCl; (c) O₃, CH₂Cl₂, puis Me₂S; (d) LiOH, MeOH

Schéma 69 : synthèse d'analogues du KG via l'ozonolyse d'acétates d'énol.

Le tableau suivant présente les rendements d'analogues du KG obtenus pour la synthèse de divers analogues du KG.

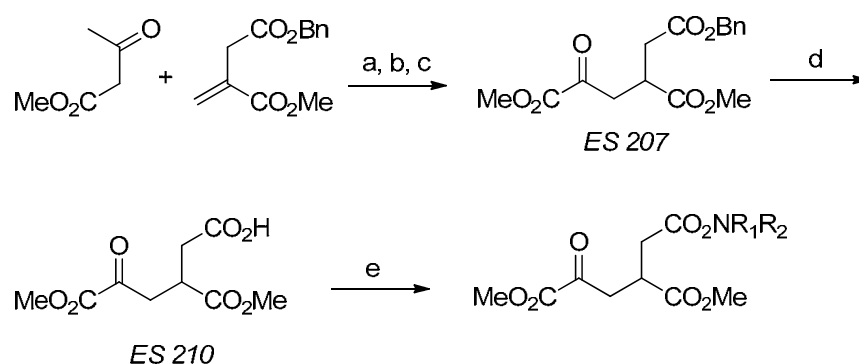
R	R ³	R ⁴	Rendements (%)		
			étape a	étape b	étape c
Me	H	Me	57	-	-
Me	Me	H	64	66	58
Me	Et	H	63	65	70
Me	Pr	H	60	61	71
Me	H	CH ₂ OBn	95	64	17
Me	H	CH ₂ CO ₂ Bn	66	60	98
Me	H	CH ₂ CO ₂ Me	78	86	72
Bn	H	CH ₂ CO ₂ Me	66	86	73
Bn	H	CH ₂ CH ₂ CO ₂ Me	74	91	59

Tableau 7 : rendements obtenus pour la synthèse d'analogues du KG.

Ces résultats montrent que cette voie de synthèse est très efficace pour accéder à une variété d'analogues du KG substitués en position 3 ou 4.

4.1.1.3 Synthèse d'une série d'amides

Le couplage de l'acide ES 210 (obtenu après déprotection sélective du composé ES 207) et d'une amine a été mise en oeuvre par E. Sagot lors de sa thèse en vue de préparer une série d'amides (**schéma 70**).



Réactifs et conditions : (d) H_2 , Pd/C, MeOH; (e) N-méthyl-Morpholine, isobutyl-chloroformate, R_1R_2NH

Schéma 70 : synthèse d'amide à partir du composé ES 210.

Cette méthode a permis d'isoler l'amide correspondant dans le cas de la diéthylamine. Cependant dans le cas de la propylamine deux isomères cycliques très stables ont été isolés résultant de l'attaque de l'azote amidique sur la fonction cétone (**schéma 71**).

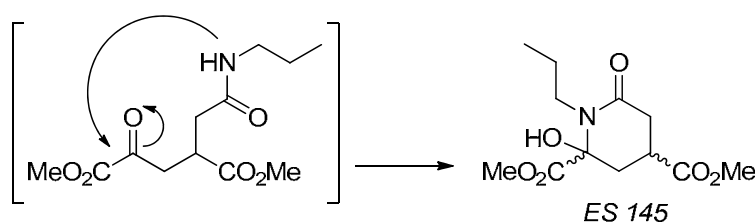
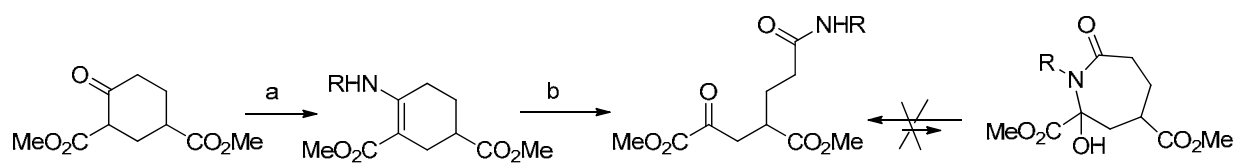


Schéma 71 : cyclisation de l'amide ES 145.

Coupure oxydante d'une énamine cyclique

Pour éviter la formation du cycle à six chaînons lors de la formation des amides, une nouvelle méthode de synthèse a été mise au point en préparant des analogues amidiques présentant une chaîne plus longue en position 4. Cette méthode est basée sur la coupure oxydante d'une énamine cyclique facilement obtenue avec un rendement quantitatif à partir

du 4-oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de méthyle. Le schéma 72 présente les différents amides synthétisés ainsi que les rendements.^{44,98}



Réactifs et conditions : (a) RNH₂, toluène, (b) O₃, CH₂Cl₂, puis Me₂S.

Analogues du KG	RNH ₂	Rendements globaux (%)
ES295	NH ₃	41
ES 272	MeNH ₂	35
ES 289	PrNH ₂	35
ES 285	BnNH ₂	43
ES 322	(Ph) ₂ CHCH ₂ NH ₂	25
ES 290	H(OCH ₂ CH ₂) ₃ NH ₂	35

Schéma 72 : synthèse des amides à partir du 4-oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de méthyle.

Les cétoesters ont bien été obtenus sous leur forme non cyclique. Cependant, les rendements sont faibles. Ceci est dû à une réaction secondaire d'élimination qui a lieu à partir de l'ozonide primaire et qui conduit à un alcool tertiaire qui est toujours isolé avec un rendement d'environ 50 %. Cette réaction est en compétition avec le réarrangement des molozonides (**schéma 73**).

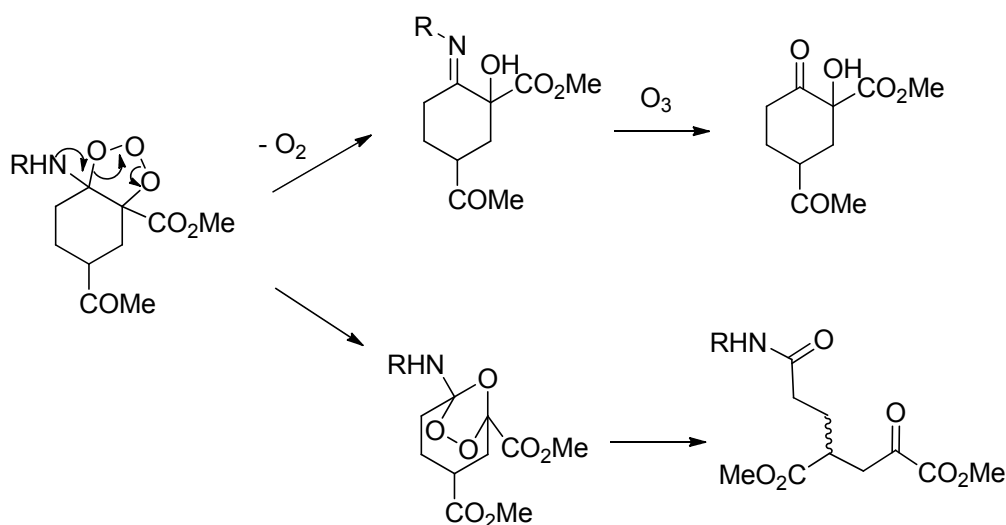


Schéma 73 : compétition entre l'élimination d'oxygène et le réarrangement des molozonides.

Cette approche a été aussi envisagée pour l'introduction de la fonction ester sur les substituants en position 4 des analogues du KG (**schéma 74**). Cependant la O-alkylation n'a pas pu être effectuée avec un rendement acceptable, quelles que soient les conditions essayées.

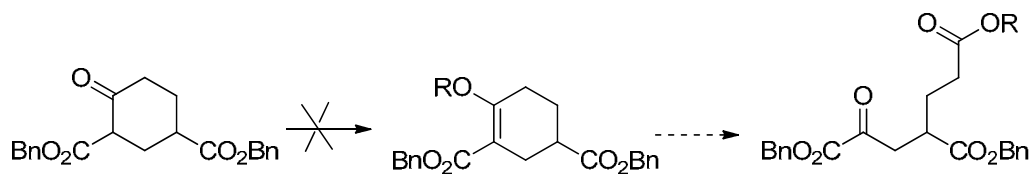
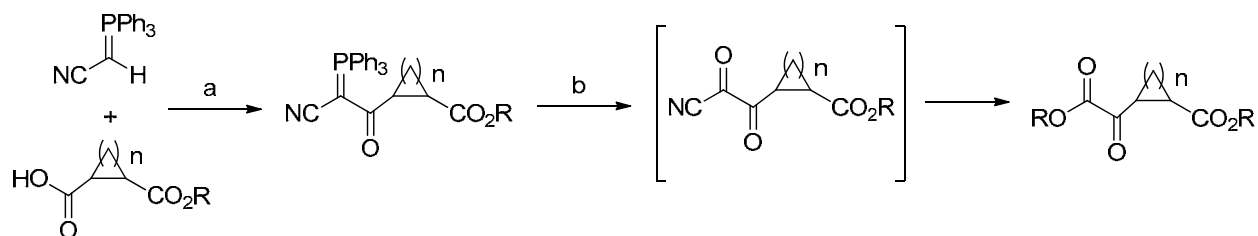


Schéma 74 : méthode envisagée pour la préparation d'analogues du KG comportant la fonction ester.

4.1.1.4 Utilisation de la méthode de Wasserman

Cette méthode a été adoptée pour préparer des analogues cycliques du KG, susceptibles d'être convertis par transamination en analogues contraints du Glu. Cette méthode développée par Wasserman et coll. constitue une approche efficace pour l'homologation d'un acide carboxylique en α -cétoester.²²⁹ L'enchaînement réactionnel débute par le couplage de l'acide avec un cyanophosphorane. L'ozonolyse du produit de couplage conduit à un α -dicétonitrile et l'alcoolyse *in situ* de ce dernier donne un α -cétoester (**schéma 75**).



Réactifs et conditions : (a) EDCI, DMAP, CH₂Cl₂ ; (b) O₃, ROH, CH₂Cl₂, puis Me₂S.

<i>R</i>	<i>n</i>	<i>configuration</i>	<i>étape a (%)</i>	<i>étape b (%)</i>
Me	1	<i>cis</i>	87	90
Me	2	<i>cis</i>	88	82
Bn	2	<i>cis</i>	89	62
Me	3	<i>cis/trans</i> (60 :40)	66	83

Schéma 75 : synthèse d'analogues cycliques du KG par la méthodologie de Wasserman.

²²⁹ H.H. Wasserman, W.B. Ho, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4364-4366.

Des rendements bons à très bons ont été obtenus dans tous les cas. Les monoesters de départ de configuration *cis* ont été préparés par alcoololyse des anhydrides correspondants. Une isomérisation *cis-trans* a été obtenue lors de l'étape finale d'hydrolyse des esters en milieu basique. Des mélanges de dérivés *cis* et *trans* ont été isolés mais toujours avec le dérivé *trans* majoritaire (>90%).⁹⁹ Dans le cas du dérivé cyclobutanique, le cétoacide de configuration *cis* a été préparé par hydrogénolyse du diester benzylique (**schéma 76**).

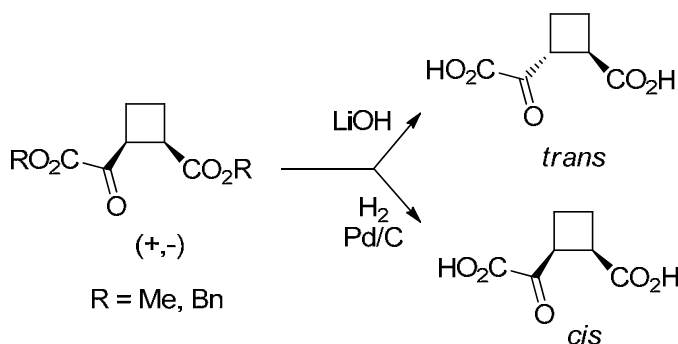


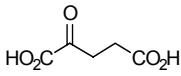
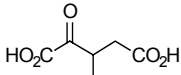
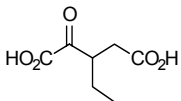
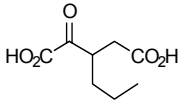
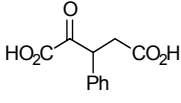
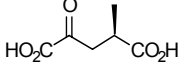
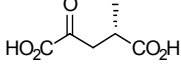
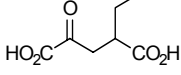
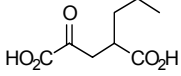
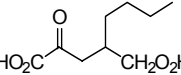
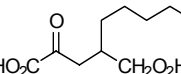
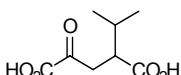
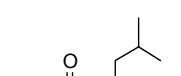
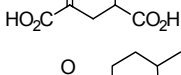
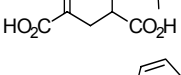
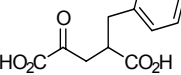
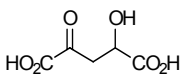
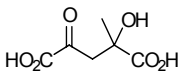
Schéma 76 : obtention des analogues du KG cyclobutaniques *cis* et *trans*.

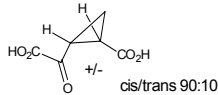
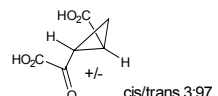
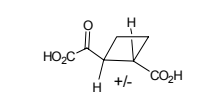
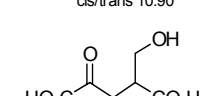
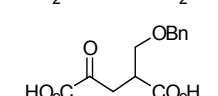
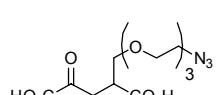
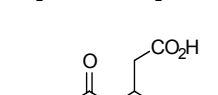
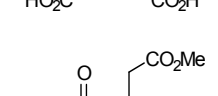
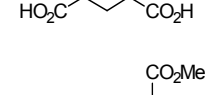
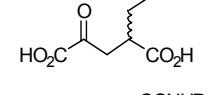
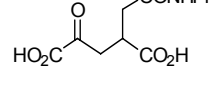
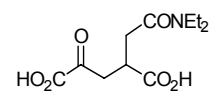
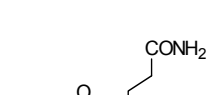
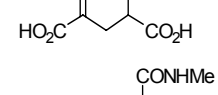
Les analogues du KG substitués en 3 et/ou 4 préparés selon les méthodes décrites ci-dessus, ont été évalués en tant que substrats des ATs disponibles au laboratoire. Les parties suivantes présentent les résultats obtenus avec l'AspAT et la BCAT, et décrivent les procédés catalytiques employés pour la préparation des différents analogues du Glu.

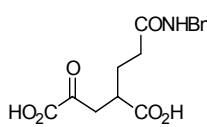
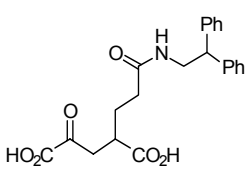
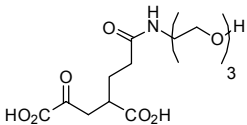
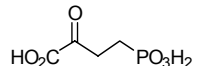
4.1.2 Etude et utilisation de l'AspAT

4.1.2.1 Etude cinétique

Le tableau suivant présente les paramètres cinétiques déterminés pour la réaction de transamination des différents analogues du KG catalysée avec l'AspAT de cœur de porc et d'*E.Coli* en présence d'acide aspartique comme donneur d'amine en concentration saturante. Les valeurs de k_{cat} et du rapport k_{cat}/K_m sont exprimées en pourcentage relatif au substrat naturel c'est à dire au KG.

Entrée	Substrat	AspAT de cœur de porc			AspAT d'E. coli		
		K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)	K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)
1		0,23	100	100	0,23	100	100
2		5,4	13	0,51	16,3	48	0,7
3		NS ^a	NS	NS	NS	NS	NS
4		NS	NS	NS	NS	NS	NS
5		NS	NS	NS	NS	NS	NS
6		0,19	120	149	0,44	50	26
7		9	9	0,2	4,8	0,9	0,04
8		0,5	130	47	1,18	60	12
9		0,5	82	37	0,43	53	29
10		0,28	58	48	0,35	51	34
11		0,25	89	83	0,31	72	54
12		4,76	11	0,5	3,8	8	0,5
13		1,48	62	9,6	1,9	52	6
14		0,47	84	41	0,62	42	15
15		0,28	82	68	0,67	37	13
16		3,8	70	4	nd ^b	nd	nd
17		7,2	20	0,6	nd	nd	nd
18		8,1	2,8	0,08	nd	nd	nd

19		nd	nd	nd	3,7	6,6	0,41
20		nd	nd	nd	9,1	0,7	0,017
21		3,9	1,9	0,11	3,7	2,8	0,18
22		10,1	3,1	0,07	4,7	1,6	0,08
23		0,65	33	12	0,09	11,0	27
24		1,0	1,7	0,4	3,2	14,2	1,0
25		22,4	0,11	0,0011	30,1	1,1	0,009
26		2,2	49	5,1	1,8	41	5,2
27		2,5	24,7	2,2	0,61	33,6	12,7
28		24,7	0,6	0,006	6,9	0,9	0,033
29		5,3	1,6	0,07	11,7	2,4	0,05
30		10,5	6,8	0,15	4,2	24,6	1,3
31		5,7	1,8	0,07	4,6	10,3	0,5
32		6,6	1,8	0,06	14,5	7,6	0,123

33		2,6	3,5	0,31	2,9	15,0	1,2
34		1,1	0,33	0,07	2,3	10,7	1,1
35		5,5	0,52	0,022	15,0	4,0	0,006
36		NS	NS	NS	NS	NS	NS

a : NS = non substrat; b : *nd* = non déterminé.

Tableau 8 : paramètres cinétiques pour les dérivés alkylés du KG.

Analogues substitués en position 3. Les 3-alkyl-KG ne sont pas de bons substrats de l'AspAT. Une faible activité exploitable en synthèse a pu être mesurée (k_{cat} rel. > 10%) uniquement dans le cas du dérivé méthylé.

Analogues substitués en position 4. Contrairement aux 3-alkyl-KG, l'AspAT est active vis-à-vis des dérivés 4-alkyl-KG. Les valeurs des paramètres cinétiques sont assez proches pour les deux AspATs. Les paramètres cinétiques ont été déterminés avec les mélanges racémiques et les valeurs obtenues correspondent vraisemblablement dans chaque cas à l'énantiomère constituant le substrat préférentiel de l'enzyme comme cela a été mis en évidence pour les dérivés 4-méthyl (entrées 6 et 7). Les valeurs de K_m devraient donc être divisées par 2. De plus, il est surprenant de voir que l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle en position 4 et la diminution de l'encombrement stérique au voisinage immédiat du C^4 (série diméthyl, *i*Pr, *i*Bu, *i*Pn) améliore l'activité de l'enzyme. La présence d'un groupement volumineux tel qu'un benzyle est également bien acceptée par l'AspAT. L'introduction de groupements polaires en position 4 tel qu'un hydroxyle ou un carboxylate produit une chute importante de l'activité de l'enzyme. Ainsi le dérivé 4-hydroxy (entrée 16) présente une affinité beaucoup plus faible que les dérivés alkylés ($K_m = 3,8$ mM). Par ailleurs, l'AspAT ne manifeste pas d'énantiosélectivité vis-à-vis de ce dérivé transformant indistinctement les deux énantiomères. L'activité de l'AspAT pour le dérivé 4-hydroxyméthyle (entrée 22) est encore plus faible ($K_{\text{cat}}/K_m = 0,07$ %) et peut s'expliquer par la cyclisation de ce composé (formation d'un hémiacétal) observée en solution. Enfin, l'activité de l'AspAT vis-à-vis du dérivé

carboxyméthyle (entrée 25) est à peine détectable. Cependant lorsque ces fonctions polaires sont masquées sous la forme d'ester méthylique ou d'éther benzylique (entrées 23 et 26), on observe une restauration de l'activité catalytique. Cette affinité de l'AspAT pour les groupements hydrophobes et volumineux en position 4 a été étudiée par E. Sagot dans le cadre d'un travail de modélisation moléculaire qui a permis d'émettre l'hypothèse que les groupements substituant l'hydrogène proR en position 4 du Glu se logent dans le tunnel hydrophobe reliant le site actif au solvant sans perturber le mode de liaison du complexe substrat-coenzyme (**figure 45**).

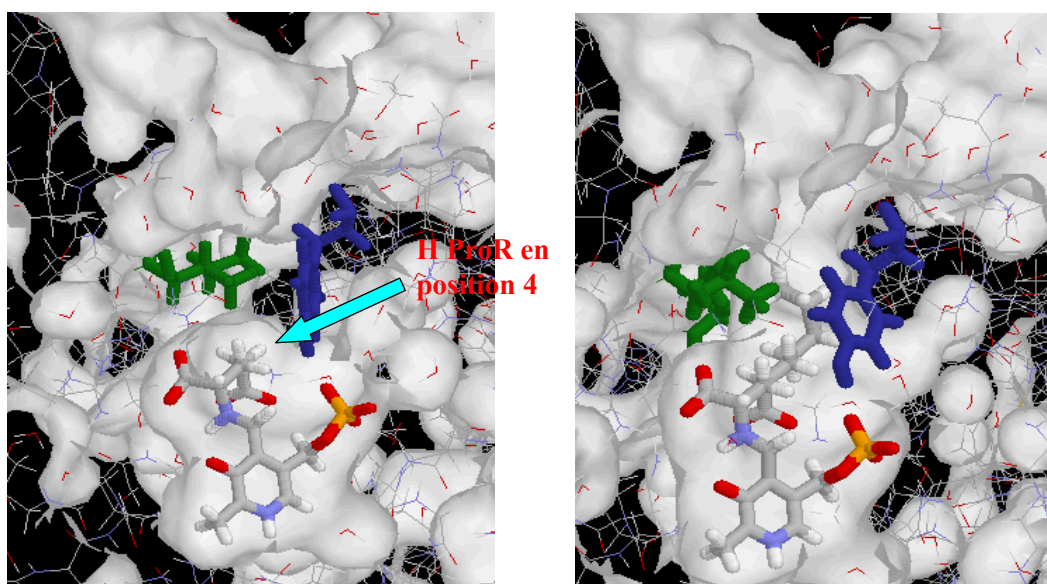


Figure 45: modèle du complexe AspAT-Glu

modèle du complexe AspAT-4-PnGlu.

Dans le cas des esters, on constate de nouveau que l'augmentation de la longueur de la chaîne en position 4 ne perturbe pas l'activité catalytique (entrée 26 et 27). Les 2 amides à chaîne courte (entrée 28 et 29) sont des mauvais substrats des AspATs. Ceci peut s'expliquer par la cyclisation observée dans le cas du propylamide et par l'encombrement stérique dans le cas du diéthylamide. Cependant des résultats meilleurs ont été obtenus avec les amides présentant une chaîne plus longue (entrées 30-35). Ces dérivés sont de moins bons substrats que les analogues alkylés, sans doute en raison de la polarité de la fonction amide qui s'accommode moins bien dans le tunnel hydrophobe du site actif de l'AspAT. Cependant dans le cas de l'enzyme d'*E.coli*, des valeurs de K_{cat} rel. voisines de 10 % ont été mesurées dans tous les cas ce qui a permis des applications en synthèse sans difficultés. Il est intéressant de souligner que des composés présentant des chaînes très longues ou très volumineuses demeurent des substrats exploitables de l'AspAT (entrées 24, 34, 35).

Dérivés disubstitués en 4: les résultats obtenus avec les 2 analogues disubstitués (entrées 17 et 18) sont cohérents avec les paramètres déterminés pour les dérivés monosubstitués 4-Me et 4-OH (entrées 6, 7 et 16) : le dérivé diméthylé est un substrat comparable à l'analogue (*S*)-4-méthyl KG. Par ailleurs, l'enzyme ne manifestant pas d'énantiosélectivité pour le dérivé 4-hydroxy, on constate que le dérivé 4-hydroxy-4-méthyl-KG est un meilleur substrat que le dérivé diméthylé et que seul l'énantiomère 4*S* est transaminé efficacement (celui présentant le méthyle dans la même position que le dérivé (*R*)-4-méthyl KG).

Analogues cycliques: Les analogues contraints cyclopropaniques et cyclobutaniques sont apparus comme des substrats médiocres de l'AspAT, cependant ici encore, les valeurs de K_{cat} compris entre 1 et 10 % ont permis une application synthétique pour préparer les analogues du Glu correspondants.

4.1.2.2 Procédé biocatalytique

Le procédé catalytique mis au point au laboratoire pour la préparation d'analogues du Glu substitués en position 4 à partir des cétoacides correspondants est présenté dans le schéma ci-dessous.

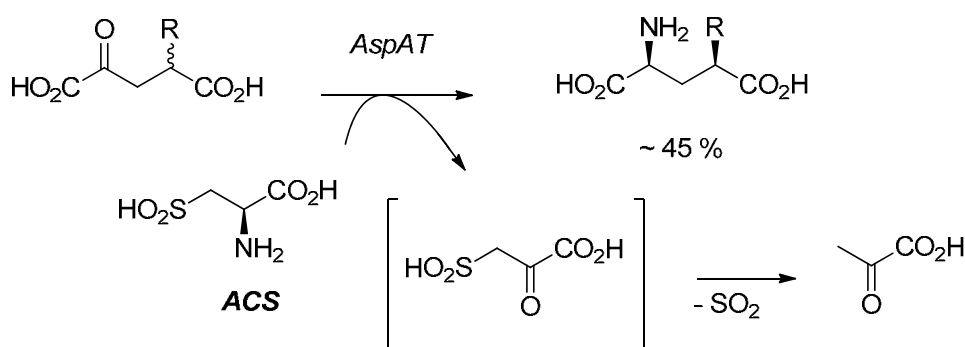


Schéma 77 : procédé de transamination pour le dédoublement cinétique des analogues du KG.

La réaction de transamination mettant en jeu les cétoacides racémiques est stoppée à un taux de conversion d'environ 45 %. Ceci permet d'effectuer le dédoublement cinétique des substrats et d'isoler l'analogue du Glu L-2,4-*syn* avec d'excellents excès énantiomériques et diastéréomériques. Le coefficient d'énantiosélectivité a pu être mesuré dans le cas du dérivé 4-Me et est supérieur à 500. Il est vraisemblablement égal ou supérieur à cette valeur pour les autres analogues substitués en position 4.

Dans ce procédé, l'ACS est utilisé comme donneur d'amine. Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'utilisation de l'ACS présente 2 avantages : il permet de déplacer l'équilibre par sa décomposition en pyruvate et SO₂ mais aussi de simplifier la procédure de

purification des acides aminés produits. En effet, à l'issue de la réaction, le dépôt du milieu réactionnel sur une colonne de résine sulfonique (H^+) permet l'adsorption sélective de l'analogue du Glu chargé positivement en milieu acide. L'ACS, quant à lui, conserve un caractère zwitterionique globalement neutre car l'acide sulfinique de l'ACS possède un pKa proche de celui des groupements sulfoniques de la résine et demeure donc largement déprotoné (**schéma 78**)

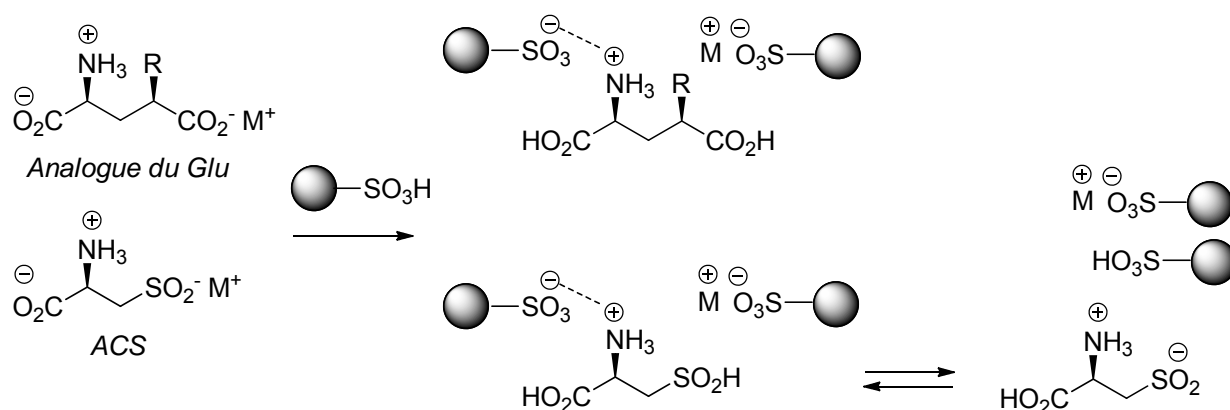
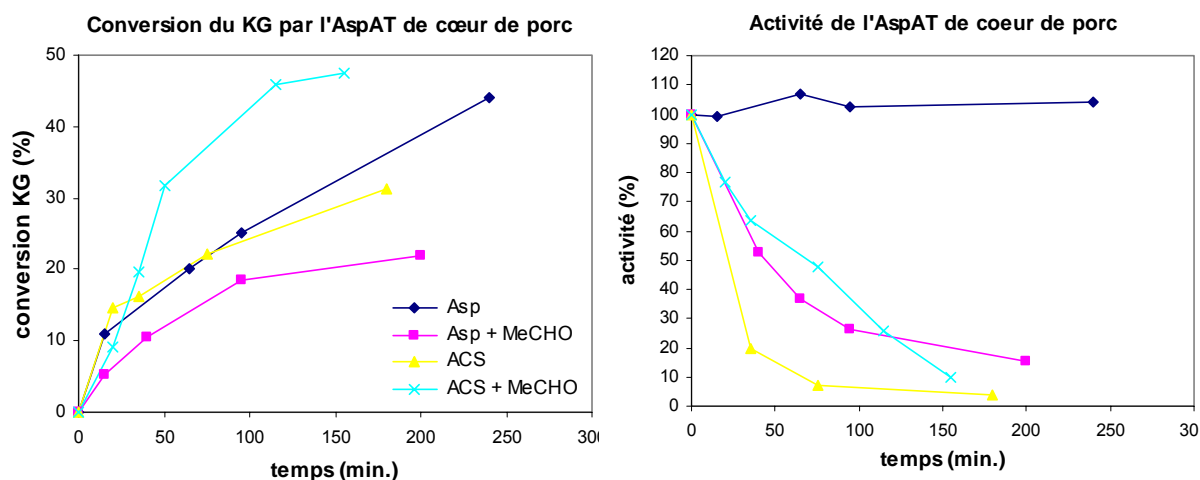


Schéma 78 : interaction des aminoacides (Glu et ACS) avec la résine sulfonique.

Cependant, les ions sulfite formés par la décomposition de l'acide pyruvylsulfinique sont à l'origine d'une inhibition de l'AspAT qui est beaucoup plus conséquente dans le cas de l'AspAT de cœur de porc que dans celui de l'AspAT d'*E.coli* (**figure 46**). Cette inhibition, de nature partiellement irréversible, serait due à l'addition d'ions hydrogénosulfite HSO_3^- sur les intermédiaires réactionnels, de types imines formés avec le coenzyme.



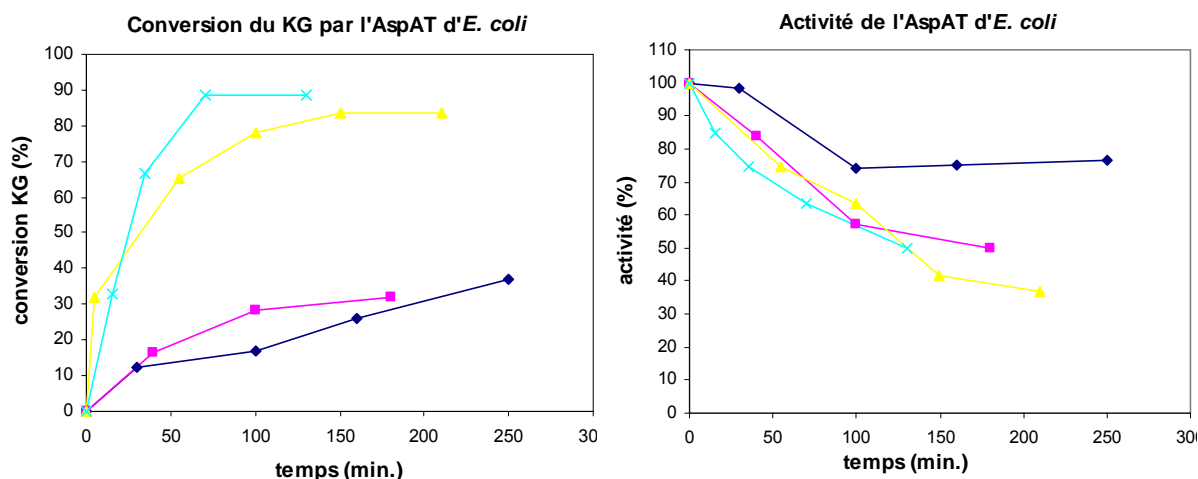


Figure 46 : taux de conversion et stabilité de l'AspAT en fonction des conditions de synthèse.

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont permis d'étudier cette inhibition et ont démontré que l'ajout d'acétaldéhyde dans le milieu réactionnel diminue l'inhibition des enzymes, optimisant ainsi le temps de réaction (**figure 46**). On peut noter cependant que l'acétaldéhyde seul produit une inhibition des enzymes dépendante du temps. L'AspAT d'*E. coli* semble la mieux adaptée au procédé de synthèse utilisant l'ACS, puisqu'elle est plus résistante à l'inhibition par les sulfites et permet d'atteindre un taux de conversion de 45 % dans un temps plus court même en l'absence de l'acétaldéhyde.

4.5.3 Synthèse des analogues du Glu en utilisant l'AspAT

La quasi-totalité des analogues de KG monosubstitués en position 4 ont été convertis en analogues du Glu de configuration L-2,4-*syn* via un dédoublement cinétique. Les produits ont été isolés avec des rendements compris entre 40 et 50% et une excellente pureté stéréochimique (ee et de > 98%). Comme évoqué précédemment, la purification de ces composés a été effectuée en déposant le milieu réactionnel sur une colonne de résine acide où seul l'analogue du Glu s'accroche. Une seconde chromatographie sur résine basique de type Dowex 1 ou Dowex 2 (AcO⁻) permet d'obtenir une excellente pureté supérieure à 98 %.



Schéma 79 : synthèse d'analogues du Glu par transamination catalysée par l'AspAT.

Les analogues du Glu porteur d'un groupement fonctionnel alcool ou acide carboxylique, ont été préparés à partir des cétoacides protégés qui comme nous l'avons vu sont bien meilleurs substrats (**schéma 80**).⁴⁴

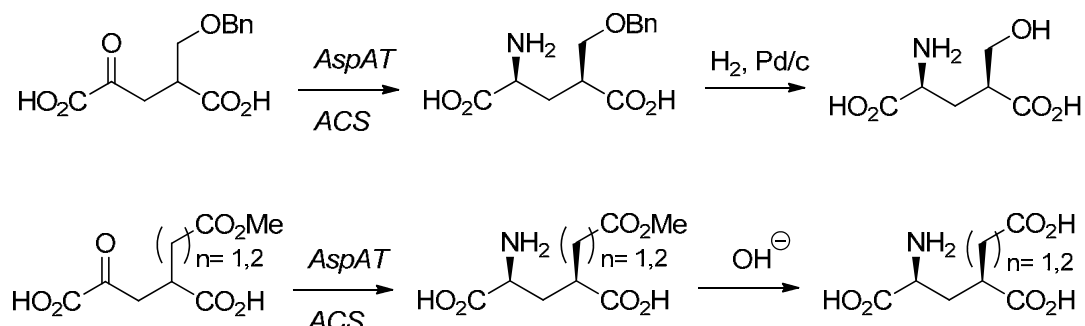


Schéma 80 : synthèse des analogues du Glu portant une fonction alcool ou acide carboxylique.

A ce jour, le dérivé 4-hydroxy est le seul analogue du Glu pour lequel l'AspAT n'a pas manifesté d'énantiosélectivité marquée. Dans ce cas, le mélange des 2 diastéréoisomères a donc été obtenu (**schéma 81**) quel que soit le taux de conversion de la réaction.²⁰⁷

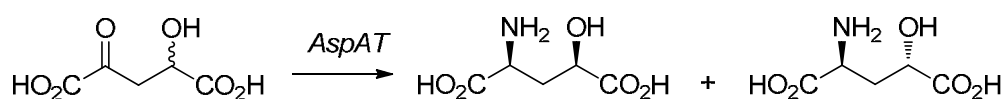


Schéma 81 : synthèse des L-syn et L-anti-4-hydroxy-Glu.

L'AspAT a également permis la synthèse du (2*S*,3*R*)-3-Méthyl-Glu²¹¹, du 4,4-diméthyl-Glu et du (2*S*,4*S*)-4-hydroxy-4-méthyl-Glu (**figure 47**).²¹⁰

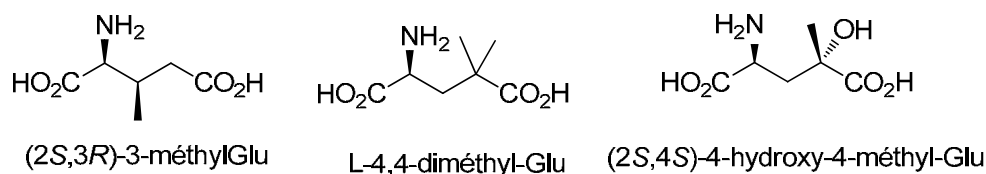


Figure 47 : analogues du Glu préparés avec l'AspAT.

De plus, les dérivés cyclobutaniques L-CBG-II-IV ont été synthétisés à partir des cétoacides *trans* et *cis* correspondants comme le schéma 75 le montre.⁹⁹ l'AspAT a manifesté une énantiosélectivité uniquement vis-à-vis du dérivé *trans* et seul le dérivé L-CBG-II a été isolé. Dans le cas du cétoacide de configuration *cis*, les isomères L-CBG-III et IV ont pu être efficacement séparés par chromatographie d'échange d'ions.

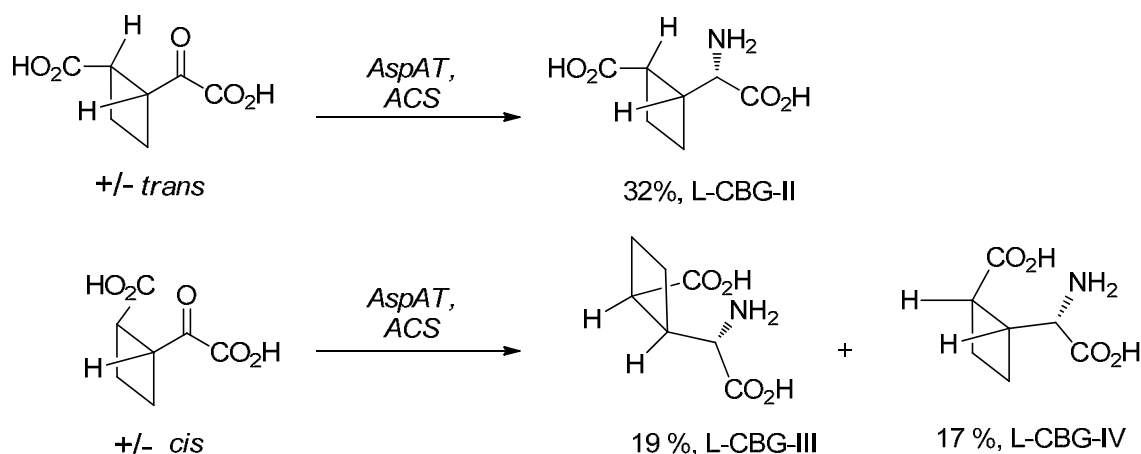
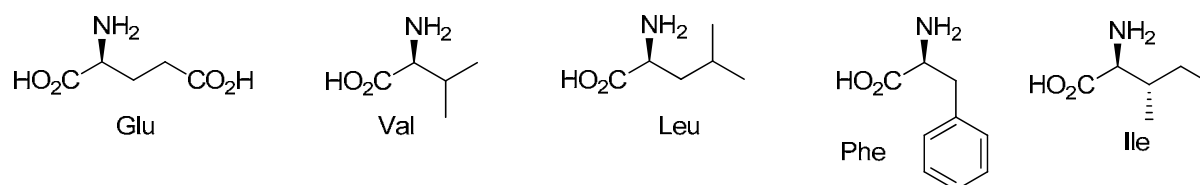


Schéma 82 : obtention des analogues du Glu L-CBG-II-IV.

Des résultats préliminaires similaires ont été obtenus avec les dérivés cyclopropaniques. L'AspAT est donc un outil très efficace pour la préparation d'une série d'analogues du Glu en particulier pour les analogues substitués en position 4 de configuration (2,4-*syn*).

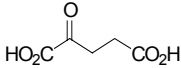
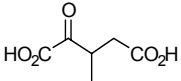
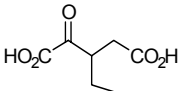
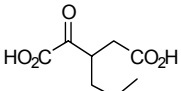
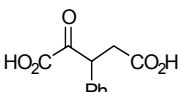
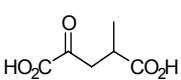
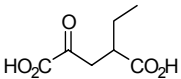
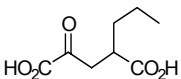
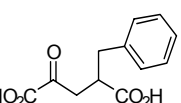
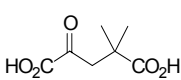
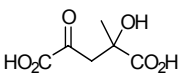
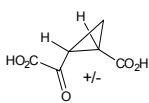
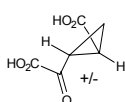
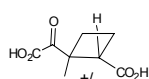
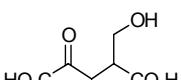
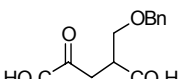
4.1.3 Synthèse d'analogues du Glu en utilisant la BCAT

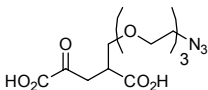
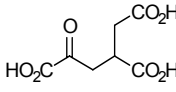
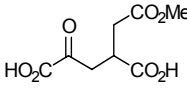
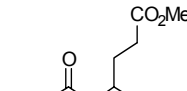
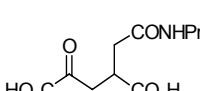
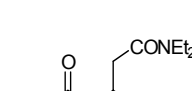

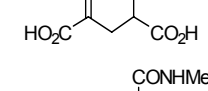
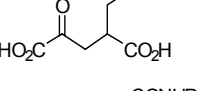
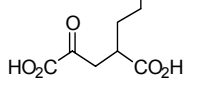
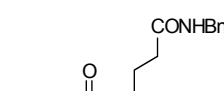
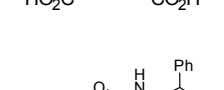
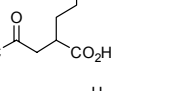
Compte tenu du spectre de substrats naturels de la BCAT qui accepte, en plus du Glu, les aminoacides branchés en position 3 ou 4 (**figure 48**), il n'est pas surprenant que cette enzyme accepte les dérivés 3 et 4-alkyl-KG.

Figure 48 : substrats naturels de la BCAT d'*E.coli*.

4.1.3.1 Etudes cinétiques

Le tableau ci-dessous résume les paramètres cinétiques mesurés avec les divers analogues du KG. Comme pour l'AspAT, les mesures cinétiques ont été effectuées sur les mélanges racémiques. De même, les k_{cat} et k_{cat}/K_m sont en pourcentage par référence au substrat naturel (KG).

Entrée	Substrat	K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)	Enantio- sélectivité
1		0,23	100	100	
2		0,22	349	242 3	-
3		0,42	205	76	-
4		1,9	93	8	+
5		1,4	75	8	+
6		0,18 3	246	211	-
7		0,26	220	130	-
8		0,68	231	52	-
9		0,81	64	12	-
10		0,20	166	127	
11		0,58	262	70	-
12	 cis/trans 90:10	0,57	1,73	0,5	nd ^b
13	 cis/trans 3:97	0,34	4,1	1,8	-
14	 cis/trans 10:90	0,28	2,3	1,2	+
15		8,5	27,4	0,7	nd
16		9,7	266	6,3	nd

17		8,0	61,2	1,7	nd
18		NS ^a	NS	NS	
19		2,6	130	11,5	
20		1,6	37,6	5,4	
21		NS	NS	NS	
22		7,9	9,1	0,3	
23		NS	NS	NS	
24		NS	NS	NS	
25		NS	NS	NS	
26		33,5	46,2	0,3	
27		NS	NS	NS	
28		NS	NS	NS	
29		6,3	12	4,6	

a : NS = non substrat

b : nd = non déterminé

Tableau 9 : paramètres cinétiques mesurés pour les dérivés du KG avec la BCAT d'*E.coli*.

La BCAT est active vis-à-vis des analogues alkylés en position 3 et 4. On observe, dans plusieurs cas, une activité supérieure à celle mesurée avec le substrat naturel. Ainsi les composés 3-méthyl-KG, 4-méthyl-KG et 4,4-diméthyl-KG montrent un rapport k_{cat}/k_m supérieur à 100 %. Aucune énantiosélectivité n'a été observée avec les dérivés en position 4 et on obtient un mélange équimolaire des 2 diastéréoisomères *L-syn* et *L-anti* quels que soient la nature du substituant et le taux de conversion de la réaction.

Dans le cas des analogues en position 3, une énantiosélectivité marquée n'a été observée que pour les substituants volumineux : un mélange des 2 diastéréoisomères *L-syn* et *anti* est ainsi obtenu dans le cas des dérivés 3-méthyle et 3-éthyle. Par contre la BCAT catalyse la formation sélective du *L-syn*-3-propyl-Glu et du *L-anti*-3-phényl-Glu. Contrairement à l'AspAT, la BCAT manifeste une très bonne activité vis-à-vis des analogues disubstitués. Ici encore, la BCAT n'est pas énantiosélective vis-à-vis du 4-hydroxy-4-méthyl-KG et produit un mélange des 2 diastéréoisomères.

La BCAT manifeste une activité faible vis-à-vis des dérivés cycliques contraints.

Les analogues du KG fonctionnalisés en position 4 sont moins bons substrats que les analogues alkylés. Ici encore, la protection des groupements alcool et acide s'est avérée avantageuse (entrées 15, 16, 18, 19). Dans la série des amides, seuls 2 analogues ont permis de mettre en évidence une activité modeste.

Enfin, contrairement à l'AspAT, la BCAT montre une bonne activité vis-à-vis de l'analogue 4-phosphonique du KG (entrée 29) et offre ainsi un accès au L-AP4. La BCAT a aussi montré une activité vis-à-vis de l'analogue méthylphosphinique, ce qui donne accès à la L-phosphinothricine (L-PPT).

4.1.3.2 Procédé biocatalytique

L'Asp et l'ACS ne sont pas des substrats de la BCAT. La stratégie directe de déplacement d'équilibre utilisant l'ACS ne peut donc pas être appliquée dans ce cas. Un système couplant la BCAT à l'AspAT a alors été utilisé (**schéma 83**). Dans ce procédé, le Glu, utilisé en quantité catalytique, joue le rôle de donneur d'amine et est régénéré par l'action de l'AspAT à partir du KG et de l'ACS. Ce procédé n'est applicable que dans le cas où l'analogue du KG n'est pas substrat de l'AspAT.

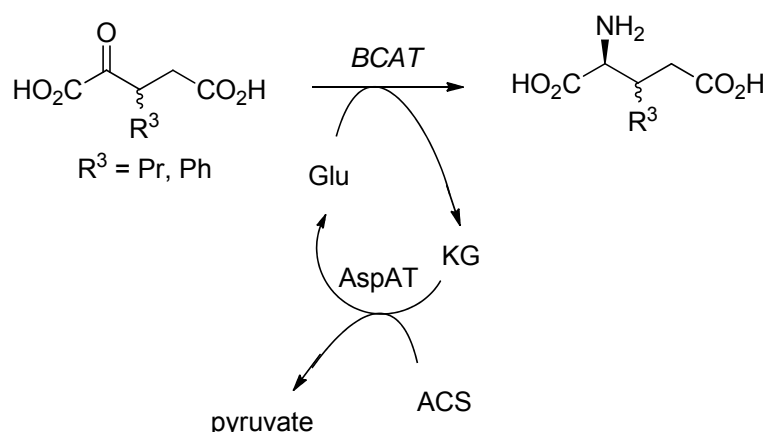


Schéma 83 : couplage de la BCAT et de l'AspAT.

Alternativement, le Glu a été régénéré en utilisant la glutamate déshydrogénase (GluDH) et en incorporant dans le milieu des ions NH_4^+ et une quantité catalytique de NADH. Ce dernier est lui-même régénéré grâce au couple Formate/Formate déshydrogénase (FDH) (**schéma 84**). Ce procédé a été appliqué aux analogues en position 4 qui sont aussi des substrats de l'AspAT.

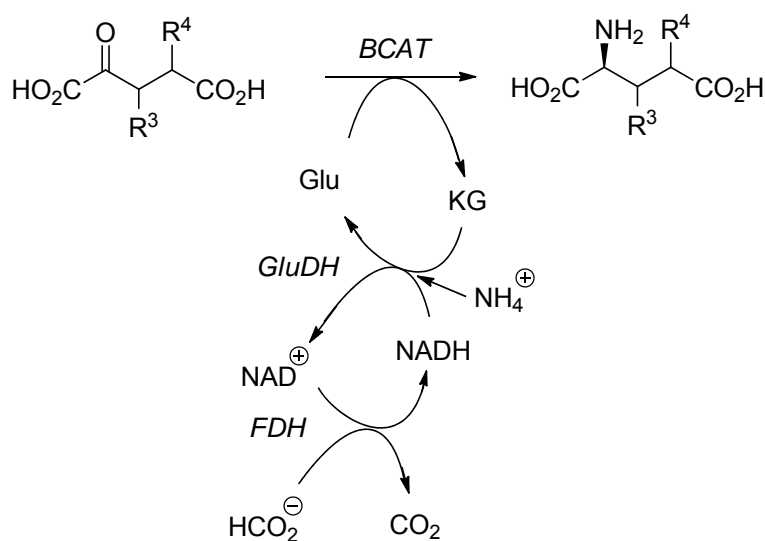


Schéma 84: couplage de la BCAT et de la GluDH.

Dans les cas où les produits de la réaction sont difficilement séparables du Glu par chromatographie (cas des 3-méthyl, 3-éthyl et 4-méthyl-Glu), l'utilisation de la leucine (Leu) comme donneur d'amine a été envisagée. Dans ce cas le couple Leu/leucine déshydrogénase (LeuDH) a été utilisé à la place du couple Glu/GluDH.

4.1.3.3 Synthèse d'analogues du Glu en utilisant la BCAT

La BCAT a été utilisée pour préparer les composés (2*S*,3*S*)-3-propyl-Glu et (2*S*,3*R*)-3-phényl-Glu à partir du mélange racémique des cétoacides correspondants (**schéma 85**). Les rendements obtenus sont de l'ordre de 40 % et les excès énantiomériques supérieures à 95 %.

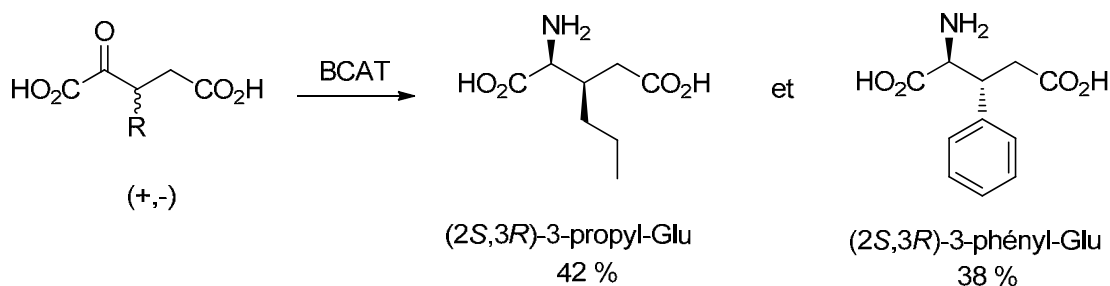


Schéma 85 : synthèse des composés (2*S*,3*R*)-3-propyl-Glu et (2*S*,3*R*)-3-phényl-Glu.

La BCAT a également été utilisée dans un procédé en deux étapes qui a permis de préparer le (2*S*,3*S*)-3-méthyl-Glu, le (2*S*,4*S*)-4-méthyl-Glu ainsi que le (2*S*,4*R*)-4-hydroxy-4-méthyl-Glu avec de bons excès diastéréoisomériques (**schéma 86**).²¹¹

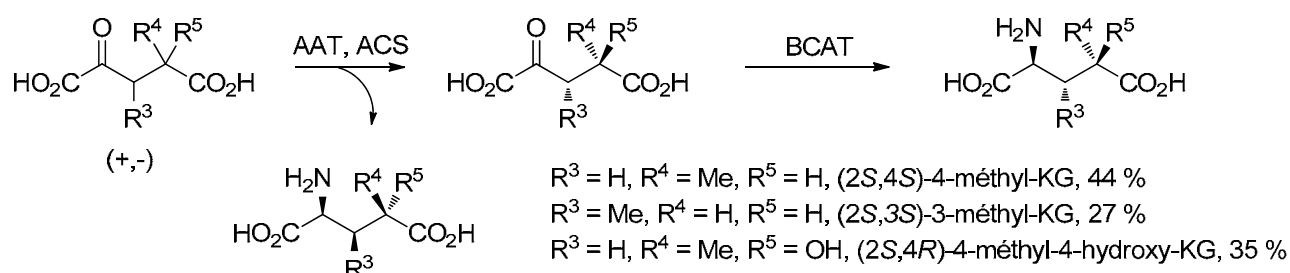


Schéma 86 : procédé en 2 étapes utilisant l'AspAT et la BCAT.

Dans une première étape, le mélange racémique des cétoacides est dédoublé sous l'action de l'AspAT jusqu'à atteindre un taux de conversion proche de 50 %. Après purification sur résine acide, le cétoacide n'ayant pas réagi avec l'AspAT, est isolé et transformé à son tour par la BCAT. Les rendements obtenus sont compris entre 27 et 44 %.

L'activité de la BCAT vis-à-vis des analogues cycliques a pu être exploitée dans le cas du dérivé *trans*-cyclobutanique. Le composé L-CBG I a ainsi été préparé via le dédoublement cinétique du cétoacide *trans* cyclobutanique (**schéma 87**). Les deux enzymes AspAT et BCAT ont donc permis de préparer les 4 stéréoisomères L-CBG I-IV.⁹⁹ La BCAT offre donc

une spécificité de substrat complémentaire à l'AspAT et l'utilisation de ces 2 enzymes permet d'accéder à une grande variété d'analogues du Glu substitués en position 3 et/ou 4.

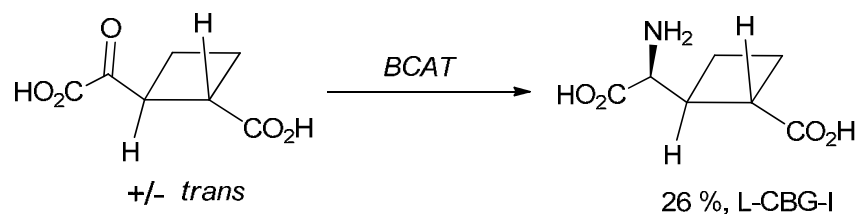


Schéma 87 : synthèse du L-CBG-I en utilisant la BCAT.

4.2 Evaluation biologique des analogues du Glu

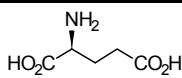
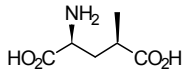
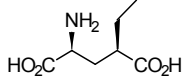
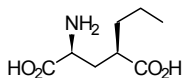
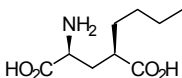
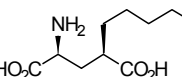
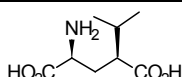
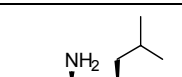
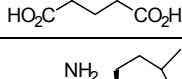
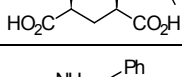
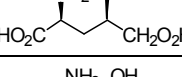
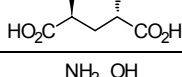
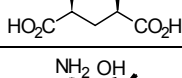
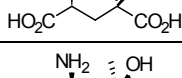
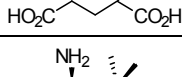
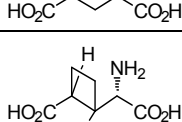
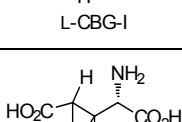
Les différents analogues du Glu synthétisés au laboratoire ont fait l'objet d'essais pharmacologiques sur différents transporteurs et récepteurs du système Glutamatergique. Ces études ont été effectuées dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. L. Bunch et du Dr. A. A. Jensen de l'Université de Copenhague.

4.2.1 Etude de l'interaction des analogues du Glu avec les EAATs

Deux tests ont été utilisés pour évaluer l'activité inhibitrice des analogues du Glu sur les EAAT1-3 exprimés dans des cellules de type HEK293 (Human Embryonic Kidney 293). Le premier est basé sur l'utilisation du radioligand [H^3]-D-Asp : l'inhibiteur entre en compétition avec le radioligand qui est un inhibiteur substrat des EAATs et empêche son transport, d'où une diminution de la radioactivité globale de la cellule HEK293. Le second test met en jeu une sonde fluorescente anionique et lipophile, le bis-oxonol (test FMP : FLIPER[®] Membrane Potential)²³⁰ : la dépolarisation de la membrane consécutive à l'activité des EAATs entraîne l'entrée de la sonde fluorescente à l'intérieur de la cellule, ce qui provoque une augmentation de sa fluorescence à 530 nm, suite à des interactions avec des protéines intracellulaire. L'inhibition des EAATs se traduit par une hyperpolarisation de la membrane, ce qui provoque la sortie de la sonde. On observe alors une diminution de la fluorescence de la cellule. Ce test présente l'avantage de différencier les inhibiteurs substrats des non substrats. En effet, un substrat utilisé seul produit une augmentation de la fluorescence tandis qu'un inhibiteur non substrat (c'est-à-dire qui bloque le transporteur sans être transporté) permet uniquement d'observer une inhibition de l'augmentation de la fluorescence induite par un substrat comme le Glu ou le D-Asp.

Le tableau suivant présente les IC50 mesurées pour les analogues du Glu inhibiteurs non substrats et les Km (en gras) déterminés pour les dérivés qui sont des inhibiteurs substrats.

²³⁰ A. A. Jensen; H. Bräuner-Osborne *Biochem. Pharmacol.* **2004**, 67, 2115-2127.

Entrée	Ligand	IC50 ou Km (en gras) (μM)		
		EAAT1	EAAT2	EAAT2
1		9,2	21	25
2		13	13	6,6
3		23	14	38
4		13	22	32
5		50	42	80
6		120	77	98
7		35	19	51
8		55	22	300
9		29	26	81
10		13	36	66
11		140	67	81
12		1000	1000	1000
13		88	48	130
14		>3000	>3000	>3000
15		>3000	>3000	>3000
16	 L-CBG-I	300-1000	300-1000	300-1000
17	 L-CBG-II	96	22	49

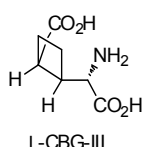
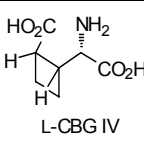
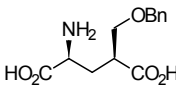
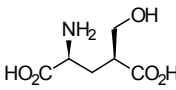
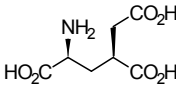
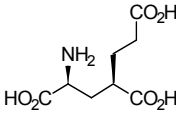
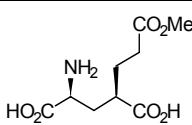
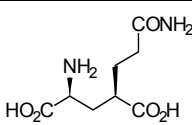
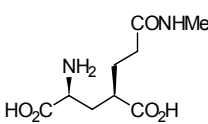
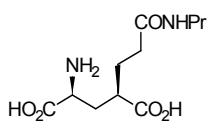
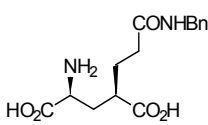
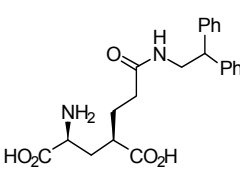
18	 L-CBG-III	~ 200	110	52
19	 L-CBG IV	~ 200	6,6	10
20		~ 1000	~ 300	>3000
21		~ 3000	~ 300	~ 3000
22		>3000	~ 3000	>3000
23		~ 3000	~ 3000	~ 3000
24		~ 1000	~ 300	>1000
25		~ 3000	~ 1000	>3000
26		> 1000	~ 1000	>1000
27		> 3000	~ 3000	3000
28		~ 1000	~ 300	~ 1000
29		~ 1000	75	~ 1000

Tableau 10 : caractérisation des interactions entre les transporteurs du Glu EAAT1-3 et les analogues du Glu préparés au laboratoire dans le test FMP.

Les analogues alkylés en position 4 (entrées 2-10) se comportent tous comme des inhibiteurs des trois types de EAATs. Ce résultat montre que la présence de substituants

volumineux et hydrophobes en position 4 ne perturbe pas la liaison aux EAATs. Cependant, seul le dérivé méthylé (entrée 2) est transporté par le sous-type EAAT1, tandis que tous les autres dérivés alkylés sont des inhibiteurs non substrats et non sélectifs. Les analogues 4-hydroxy-Glu (entrées 11 et 12) sont des substrats des trois types d'EAATs, le dérivé (2,4)-*anti* présentant une affinité supérieure à celle de l'isomère (2,4)-*syn*. Les analogues disubstitués 4-hydroxy-4-méthyl-Glu (entrées 13 et 14) sont, quant à eux, des inhibiteurs non substrats avec, ici encore une affinité plus grande pour l'isomère (2,4)-*anti*. Aucune sélectivité n'a été observée pour ces dérivés hydroxylés. Par ailleurs le dérivé disubstitué 4,4-diméthyl-Glu (entrée 15) ne présente aucune activité ni sélectivité marqué.

Dans la série des 2-(carboxycyclobutyl)glycines (L-CBG I-IV, entrées 16-19), le L-CBG I se comporte comme un substrat avec une affinité faible pour les trois types de EAATs. Au contraire, le stéréoisomère *trans* L-CBG II a montré un profil pharmacologique particulier: cet analogue est un substrat de EAAT1 et un inhibiteur des EAAT2 et 3. Le dérivé *cis* L-CBG III, est un inhibiteur non substrat et non sélectif, comparable aux dérivés alkylés, tandis que l'analogue L-CBG IV montre une certaine sélectivité pour les sous-types EAAT2 et 3.

Les analogues du Glu fonctionnalisés en position 4 par des fonctions alcool, éther, acide carboxylique, ester ou amide sont également des inhibiteurs non substrats de faibles affinité et sélectivité vis-à-vis des EAATs. Seul l'analogue amidique comportant un groupement diphenyléthyle (entrée 29) est un inhibiteur non substrat présentant une bonne sélectivité en faveur du sous-type EAAT2.

4.2.2 Interaction des analogues du Glu avec les iGluRs

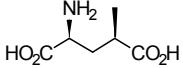
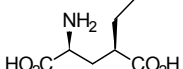
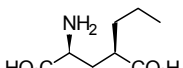
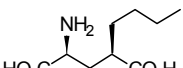
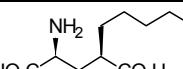
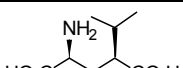
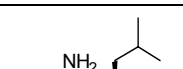
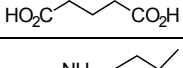
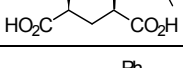
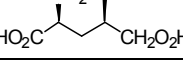
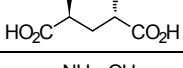
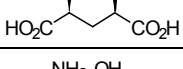
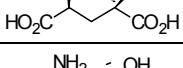
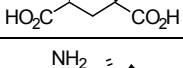
Les analogues du Glu préparés au laboratoire ont été également évalués vis-à-vis des iGluRs et sur différents types de sous-unités des KARs. Les essais pharmacologiques ont été réalisés avec des préparations de membranes de cerveau de rats en utilisant dans des essais de compétition le radioligand [H^3]AMPA pour les AMPARs, le [H^3]CGP39653 (acide D-L-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-pent-3-énoïque) pour les NMDARs et le [H^3]KA pour les KARs.²³¹

Les récepteurs recombinants GluK1-3 (= GluR5-7) humains ont été exprimés dans des cellules d'insectes *Sf9* par infection baculovirale. L'affinité des analogues du Glu sur les

²³¹ M. B. Hermit, T. B. Stensbøl, H. Bräuner-Osborne *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 486, 241-250.

différentes sous-unités des KARs a été déterminée par compétition avec le radioligand ($[H^3]$)-(2*S*,4*R*)-4-méthyl-Glu).^{44, 232}

Le tableau suivant présente les valeurs de K_i mesurées dans les tests pour les différents analogues du Glu.

Entrée	Ligand	iGluR IC50(μ M)			sous-unités des KARs Ki (nM)		
		AMPA	KA	NMDA	GluK1	GluK2	GluK3
1		4,8	0,017	10	7	17	6
2		16	0,12	28	2,08	75,5	27,5
3		78	0,7	>100	11,31	458	141
4					4,4	>100	
5					7,5	>100	
6		>100	1,4	~75	37,7	2270	383
7		>100	5,6	>100	63,5	4690	1596
8		42	>100	>100	20,5	>100	6167
9					154	>100	
10		34	9,1	4	3740	7432	28134
11		>100	31	1,3	4175	21416	14938
12		24	0,75	>100	17,9	800	182
13		>100	16	>100	1180	55600	7840
14		>100	7,4	>100	168	4670	1090

²³² U. Madsen, D. S. Pickering, B. Nielsen, H. Bräuner-Osborne *Neuropharmacology* **2005**, 49, 114-119.

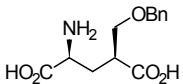
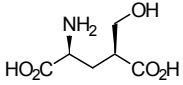
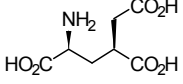
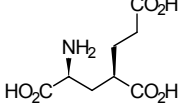
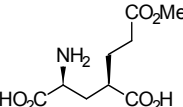
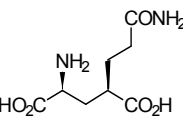
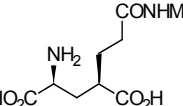
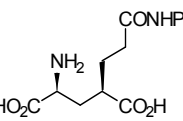
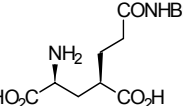
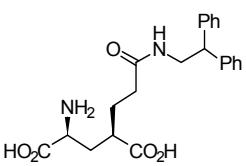
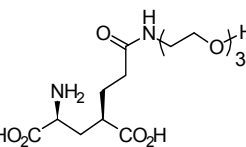
15		>100	12	26	~ 1000	~ 1000	10000
16		44	0,24	15	n.t.	n.t.	n.t.
17		>100	39	>100	5000	5000	10000
18		>100	>100	52	~ 1000	>100	50000
19		31	7,9	>100	42,8	6670	1010
20		25	16	>100	7,45	9660	2820
21		32	29	>100	3,81	123	57,3
22		74	41	>100	641	10600	3460
23		>100	>100	72	138	>100000	21400
24		>100	>100	>100	37000	>100	>100
25		n.t.	n.t.	n.t.	~ 100	~ 100	~ 100

Tableau 11 : affinités des analogues du Glu pour les iGluRs et vis-à-vis des sous-unités iGluR5-7.

Les analogues alkylés en position 4 (entrées 1-7) sont des ligands des iGluRs avec une sélectivité marquée pour les KARs et en particulier pour GluK1. L'analogue iPr-Glu (entrée 3) a montré une affinité pour les AMPARs natifs et également une sélectivité vis-à-vis de GluK1. Le dérivé *anti*-4-hydroxy-Glu (entrée 10) n'a pas manifesté de sélectivité vis-à-vis des iGluRs, tandis que l'isomère *syn* a montré une préférence pour les NMDARs natifs et une affinité négligeable pour GluK1-3. Les 3 dérivés disubstitués en position 4 (entrées 12-14)

présentent une sélectivité vis-à-vis des KARs et du sous-type GluK1. Le dérivé (2*S*,4*S*)-4-hydroxy-4-méthyl-Glu (entrée 12) a montré les meilleures affinités parmi ces 3 composés.

Les analogues du Glu fonctionnalisés en position 4 par des fonctions alcool, éther, acide carboxylique et amide ont montré dans l'ensemble, de faibles affinités et sélectivités pour les trois types d'iGluRs natifs. Seul le 4-hydroxyméthyl-Glu (entrée-16) présente une affinité submicromolaire pour les KARs. L'ester méthylique et l'amide primaire (entrées 19 et 20) présentent une forte affinité (42,8 et 7,45 nM) pour GluK1 et une faible affinité pour GluK2 et 3 (1-10 μM). De façon inattendu, ce profil d'activité ne se retrouve pas pour le dérivé méthylamide (entrée 21) qui a montré une affinité non négligeable pour les trois sous-types GluK1-3 ($K_i = 3,81, 123$ et $57,3$ nM respectivement). L'activité agoniste ou antagoniste n'a pas été déterminée pour ces trois ligands (entrées 19-21). Dans le cas des dérivés propylamide et benzylamide (entrées 22 et 23) une préférence pour GluK1 a été observée mais avec une faible affinité ($K_i = 641$ et 138 nM). Enfin, les analogues présentant des groupements volumineux (entrées 24 et 25) n'ont manifesté aucune activité notable vis-à-vis des iGluRs.

4.2.3 Essais pharmacologiques avec les mGluRs

Certains analogues ont aussi fait l'objet de tests vis-à-vis de certains mGluRs: mGluR1 et 5 du groupe I, mGluR2 et 3 du groupe II et mGluR4 du groupe III. Les différents sous-types ont été clonés et exprimés dans des cellules CHO (cellules ovariennes de Hamster) et l'affinité a été déterminée par compétition avec le radioligand [3 H]LY341495.⁴⁴ L'activité agoniste pour le groupe I a été déterminée par la mesure des niveaux de calcium intracellulaire. Cette étude repose sur l'utilisation d'un composé (le Fluo-4) dont la fluorescence augmente en présence d'ions Ca^{2+} . Pour les groupes II et III, la mesure du taux d'AMPc a permis de mettre en évidence une éventuelle activité agoniste. La co-application du Glu et du ligand permet de détecter une éventuelle activité antagoniste.^{228, 229} Ces résultats, non publiés à ce jour, ne peuvent être présentés en détail. Cependant, certains méritent d'être évoqués: Le dérivé 4-carboxypropyl-Glu (entrée 18, tableau 11) et le dérivé contraint L-CBG II (entrée 17, tableau 10) se comportent comme des agonistes sélectifs des récepteurs métabotropiques du groupe II avec des affinités d'ordre micromolaire. Ces résultats sont importants compte tenu des potentialités thérapeutiques des agonistes du groupes II que nous avons évoqué précédemment.

PROJET DE RECHERCHE

Ce travail de thèse a eu pour objectif la synthèse d'analogues du Glu mettant en œuvre des aminotransférases, afin d'accéder principalement à des ligands sélectifs des différents récepteurs et transporteurs du système Glutamatergique.

Bien que la mise au point de ligands orthostériques dotés d'une forte sélectivité au sein du système glutamatergique soit un réel challenge, ces molécules présentent un faible risque d'interactions non spécifiques avec diverses protéines au sein de l'organisme. Ces structures sont caractérisées par une forte polarité et une grande solubilité dans l'eau. Bien que cela soit un handicap pour le franchissement passif des membranes et des compartiments hydrophobes, ces ligands orthostériques peuvent cependant être pris en charge par des systèmes de transport des aminoacides. Les ligands orthostériques peuvent ainsi permettre d'éviter les inconvénients rencontrés avec les modulateurs allostériques tels que l'instabilité métabolique, la faible solubilité et l'activité hors cible.

Notre approche chimioenzymatique utilisant des ATs présente aussi l'intérêt de mimer les processus métaboliques de synthèse du Glu au sein du SNC. Les analogues du KG que nous préparons présentent donc eux-mêmes un intérêt en tant que "prodrogues" potentielles.

1 Principaux résultats pharmacologiques obtenus précédemment

Comme nous l'avons évoqué dans la chapitre précédent, des résultats intéressants ont été obtenus avec certains analogues fonctionnalisés en position 4 et avec le dérivé cyclobutanique L-CBG-II (**figure 49**).

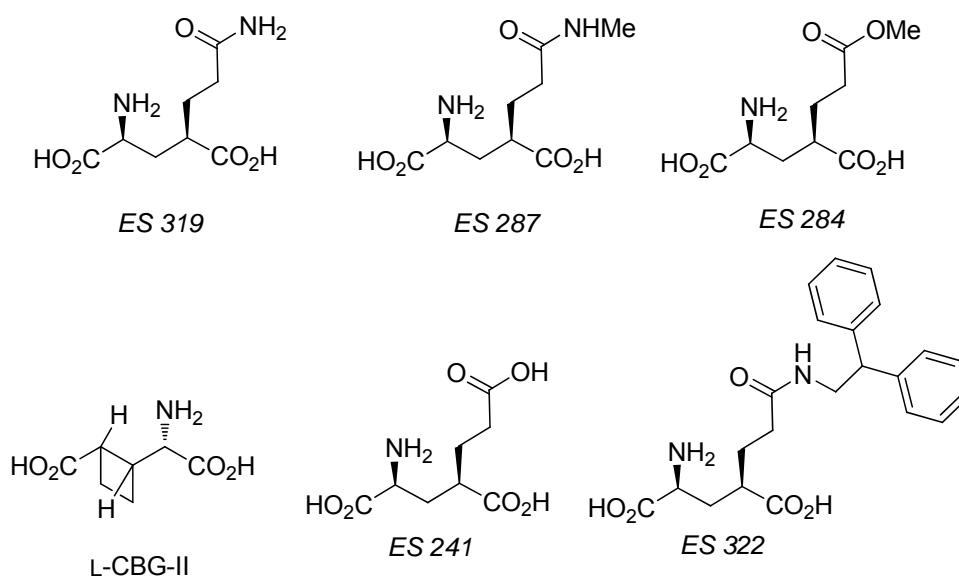


Figure 49 : principaux analogues du Glu qui ont montré une activité intéressante dans le système Glutamatergique.

Nous avons donc envisagé la synthèse de composés dérivés de ces structures afin d'augmenter l'affinité et la sélectivité pour les différents récepteurs et transporteurs du système Glutamatergique.

2 Synthèse d'analogues du Glu substitués en position 4

2.1 Synthèse de nouveaux amides

Nous avons envisagé la synthèse d'une série d'amides et d'un hydrazide afin d'établir des interactions supplémentaires permettant éventuellement d'augmenter l'affinité et la sélectivité vis-à-vis des KARs. Nous avons donc envisagé de préparer de nouveaux composés comportant les différents groupements décrits dans la figure suivante mais aussi de préparer à nouveau les deux composés ES 319 et ES 287 afin de déterminer s'ils présentent une activité agoniste ou antagoniste du sous-type GluK1.

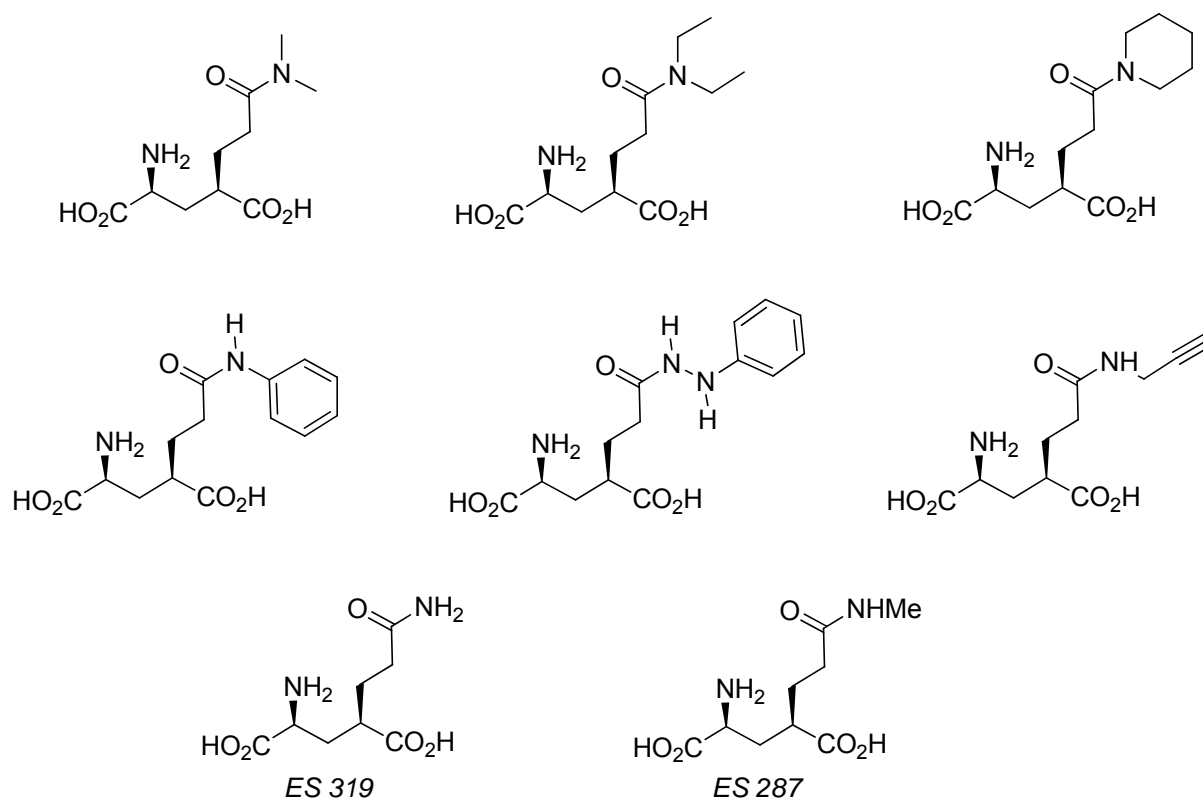


Figure 50 : structures d'analogues envisagés, ligands potentiels des KARs.

La synthèse d'analogues du composé ES 322 a aussi été envisagée afin d'augmenter l'affinité vis-à-vis des EAAT2. Différentes modifications portant sur le groupement diphénylméthyle ont été considérées. La figure ci-dessous représente la série des nouveaux analogues que nous avons souhaité préparer.

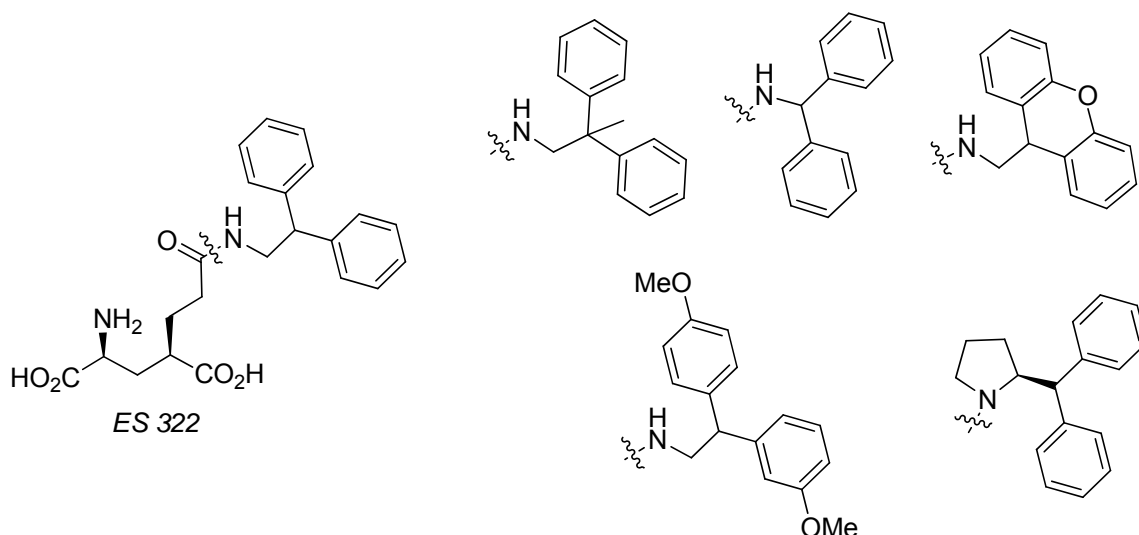


Figure 51: différents analogues du dérivé **ES 322** envisagés

Afin d'accéder efficacement à ces analogues du Glu et à leurs précurseurs analogues du KG, il est apparu important de développer et d'améliorer l'approche générale développée par E. Sagot (**schéma 88**), afin d'éviter notamment les problèmes rencontrés lors de la coupure oxydante de l'énamine cyclique évoqués précédemment (**schéma 73**, page 112).

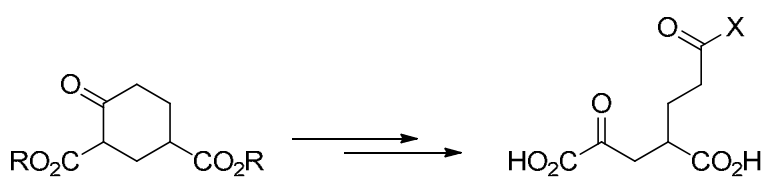


Schéma 88 : synthèse d'analogues du KG fonctionnalisés.

2.2 Synthèse d'hydroxamates et d'un dérivé tétrazole

Nous avons aussi envisagé la synthèse d'analogues du Glu fonctionnalisés en position 4 par un groupement hydroxamate (**figure 52**). Ces derniers sont des analogues des amides ES 319 et ES 287 mais aussi du composé ES 241 présentant la fonction acide carboxylique et qui est un ligand sélectif des mGluRs du groupe II.

Un analogue présentant un cycle tétrazole bioisostère de la fonction acide a aussi été envisagé (**figure 52**).

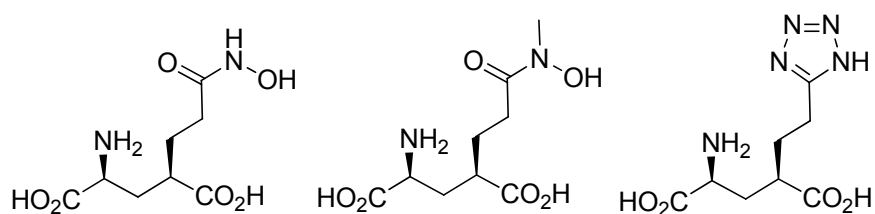


Figure 52 : structure des hydroxamates et du dérivé tétrazole envisagés.

3 Analogue du composé L-CBG II

Une étude de modélisation effectuée par le Dr. Bunch lui a permis de supposer que l'introduction de la fonction amide (**Figure 53**) au niveau du cycle du L-CBG-II pourrait permettre d'améliorer l'efficacité et la sélectivité d'action par rapport au dérivé cyclobutanique. Nous avons ainsi envisagé la synthèse d'un nouvel analogue contraint incluant un cycle β -lactame.

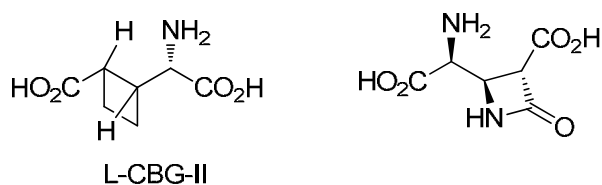


Figure 53 : structure d'un analogue du L-CBG II envisagé.

4 Nouvelle approche synthétique

Parallèlement à la synthèse de ces nouveaux analogues, nous avons cherché à faire évoluer notre approche synthétique (**schéma 89**). Notre stratégie consiste à préparer une variété d'analogues du KG qui sont ensuite convertis en analogues du Glu s'ils sont substrats des ATs. Afin d'accéder plus simplement à une grande diversité structurale, il paraît intéressant de préparer un nouvel analogue du Glu qui pourrait être dérivé après l'étape de transamination. Cela nous permettrait en particulier de nous affranchir de la spécificité de substrat des ATs.

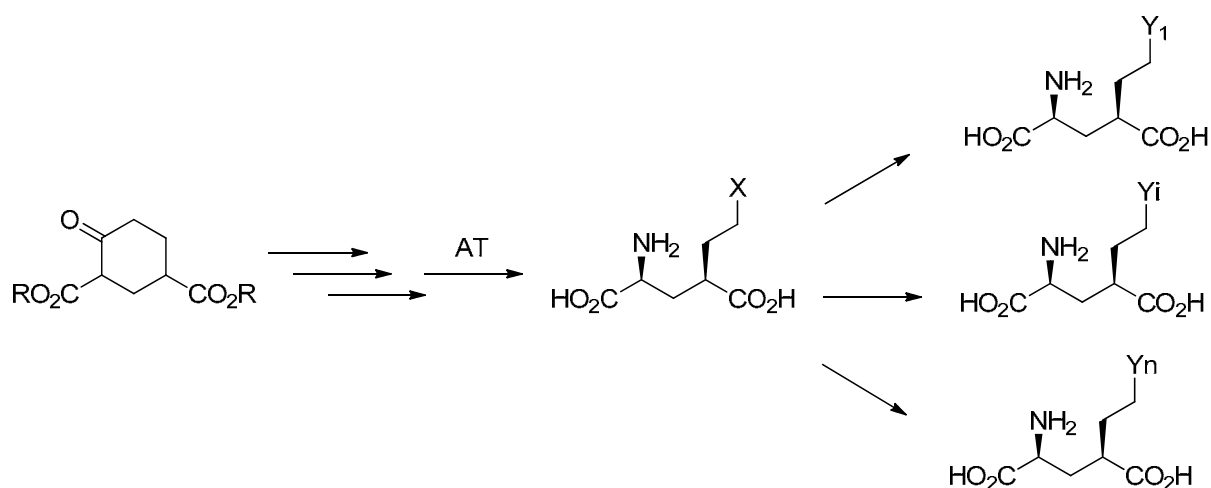


Schéma 89 : nouvelle approche synthétique.

Plusieurs candidats ont été envisagés : des analogues présentant en position 4 une fonction amine permettant une réaction avec une variété d'électrophiles, un ester aromatique pouvant interagir avec divers nucléophiles, ou encore un azoture permettant d'utiliser des

méthodes de type « chimie click » par cycloaddition sur une variété d'alcyne. Il faut noter que l'amide propargylique évoqué dans les pages précédentes a aussi été conçu dans cet objectif (**Figure 54**).

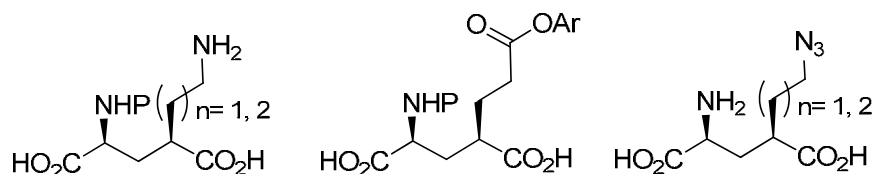


Figure 54 : analogues du Glu pouvant être dérivés.

5 Synthèse de la phosphinothricine (PPT) et de ses dérivés

Une autre partie de cette thèse a concerné la synthèse stéréosélective de la PPT et de ses dérivés dans le cadre du programme ANR Herbitox. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la PPT est un analogue phosphoré du Glu qui est largement utilisée en tant qu'herbicide. Cependant son activité neurotoxique avérée pose des questions de santé publique. Il faut noter que la PPT utilisée est disponible dans le commerce sous sa forme racémique alors que seule la L-PPT présente une activité herbicide. Notre tâche a consisté à préparer la PPT sous ses formes énantiopures D et L ainsi que plusieurs de ses dérivés et de ses métabolites (**Figure 57**) en vue d'une étude toxicologique chez la souris.

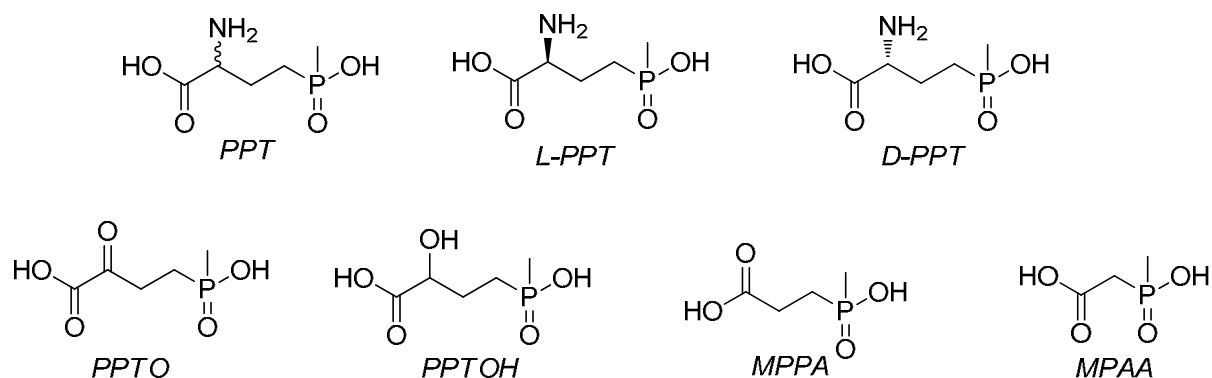


Figure 55 : L-PPT, métabolites et dérivés.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1 Synthèse des analogues du KG fonctionnalisés en 4 - développement d'une nouvelle méthode de synthèse

Nous avons vu précédemment que la méthode basée sur la coupure oxydante d'une énamine cyclique (**schéma 72**, page 112) a permis de préparer plusieurs analogues du KG fonctionnalisés par une fonction amide en position 4. Les cétoesters ont été isolés avec un faible rendement en raison de la réaction parasite qui a lieu durant l'ozonolyse (**schéma 73**, page 112). De plus cette méthode interdit l'introduction de groupements sensibles à l'oxydation au niveau de l'amine car cette dernière est additionnée avant l'étape d'ozonolyse. Enfin, cette stratégie de synthèse n'a pas permis d'accéder aux esters du fait des difficultés rencontrées lors la synthèse des éthers d'énol (**schéma 74**, page 113).

Nous avons donc entrepris de mettre au point une voie de synthèse alternative décrite dans le schéma 90. Cette approche consiste à préparer, en 2 étapes à partir de la cyclohexanone I, un intermédiaire de type anhydride mixte carbonique III. Ce dernier peut alors réagir avec une variété d'agents nucléophiles comme des alcools ou des amines offrant un accès à une variété d'analogues plus grande que la méthode précédente.

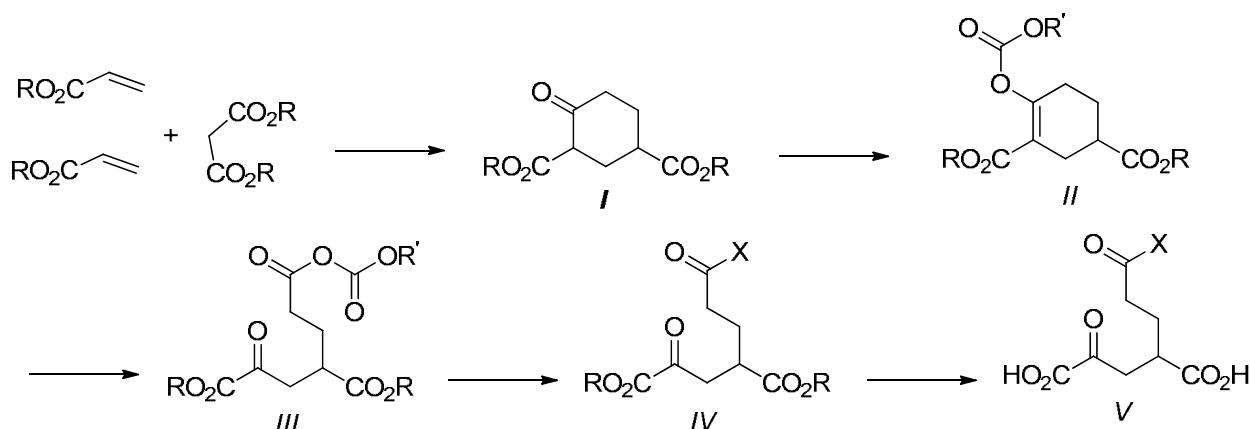


Schéma 90 : stratégie alternative envisagée pour la synthèse des analogues du KG.

1.1 Synthèse de la cyclohexanone I

1.1.1 Synthèse du 4-oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de diméthyle (4)

Nous avons reproduit la synthèse décrite dans la littérature et utilisée par E. Sagot durant sa thèse. Cette méthode repose sur une double condensation de Michael du malonate d'éthyle sur deux molécules d'acrylate d'éthyle. Après obtention du triester **3**, une condensation de Dieckmann donne accès à la cyclohexanone **4**. Plusieurs modifications ont été apportées pour optimiser cette dernière réaction: pour des raisons de sécurité, nous avons réalisé la réaction

de Dieckmann dans le toluène au lieu du benzène, et préparé au préalable le méthylate de sodium (MeONa) par addition de Na dans un mélange MeOH/ toluène 1/2. Ces modifications expérimentales ont permis d'améliorer le rendement de la réaction de synthèse de la cyclohexanone **4** qui a été obtenue avec un rendement global de 68 % (60 % précédemment). Notons que le composé **4** est exclusivement observé par RMN sous sa forme énol en solution dans CDCl_3 .

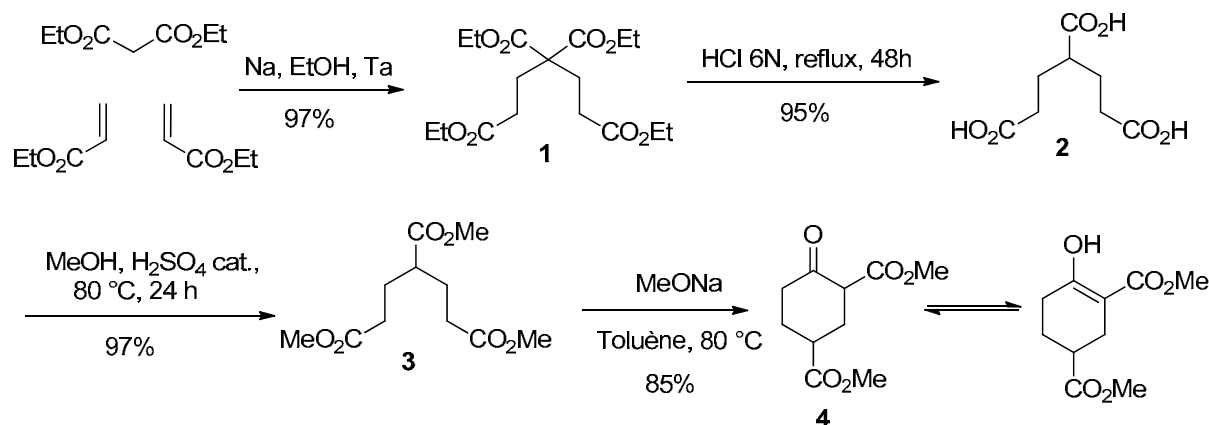


Schéma 91 : synthèse de la cyclohexanone **4**.

1.1.2 Synthèse du 4 oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de dibenzyle (**6**)

La cyclohexanone **6** constitue un précurseur pour préparer des esters de type V ($X = \text{OR}''$, schéma 90) et permet une déprotection sélective des esters carboxyliques α et γ du céto-glutarate au cours de l'étape IV \rightarrow V. Ce composé a été préparé en adaptant la synthèse du composé **4**: le triacide carboxylique **2** a été benzylé puis soumis à la condensation de Dieckmann en utilisant une suspension de benzylate de sodium (BnONa) fraîchement préparée dans le toluène. Comme dans le cas précédent nous avons pu améliorer le rendement global de la synthèse de **6** qui atteint 50 % (27 % précédemment).

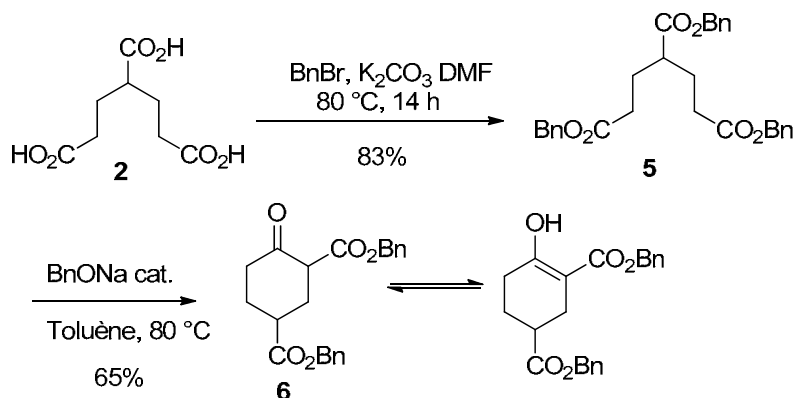


Schéma 92 : synthèse de la cyclohexanone **6**.

1.1.3 Essais pour réduire le nombre d'étapes

Afin de réduire le nombre des étapes de synthèse de la cyclohexanone, nous avons essayé une méthode alternative représentée dans le schéma ci-dessous. Cette méthode enchaîne la double condensation de Michael et la réaction de Dieckmann en un "seul pot". Plusieurs exemples de cette réaction sont décrits dans la littérature.^{233, 234} Une étape de décarboxylation régiosélective pourrait ensuite permettre d'obtenir la cyclohexanone **4**.

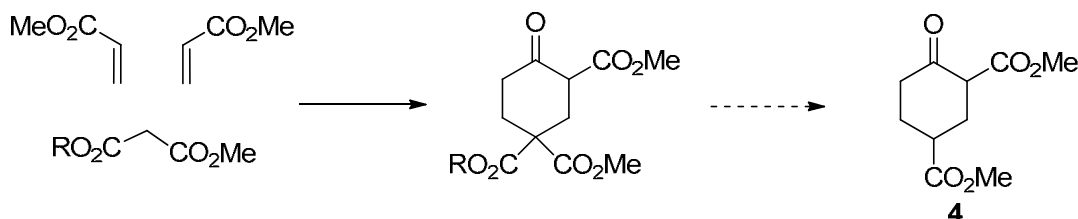


Schéma 93 : méthode alternative hypothétique pour la synthèse de la cyclohexanone **4**.

1.1.3.1 Synthèse du 4-oxocyclohexane-1,1,3-tricarboxylate de triméthyle (**7**)

Le composé **7** a été obtenu selon une méthode décrite dans la littérature (schéma **94**).²³⁴ Cette réaction a été réalisée dans le THF en présence de NaH (2,5 équivalents) qui assure la double condensation de Michael et la réaction de Dieckmann. Le composé **7** a ainsi été obtenu avec un rendement de 42 %. Ce résultat est assez différent de celui mentionné dans la littérature²³⁴ où il est annoncé un rendement quantitatif sans purification. Ce faible rendement s'explique en partie par la formation d'un sous-produit de monoaddition (**8**) qui n'a pas été signalé dans la littérature. L'obtention de ce produit n'a pas pu être évitée en variant les conditions expérimentales (excès d'acrylate, temps plus long).

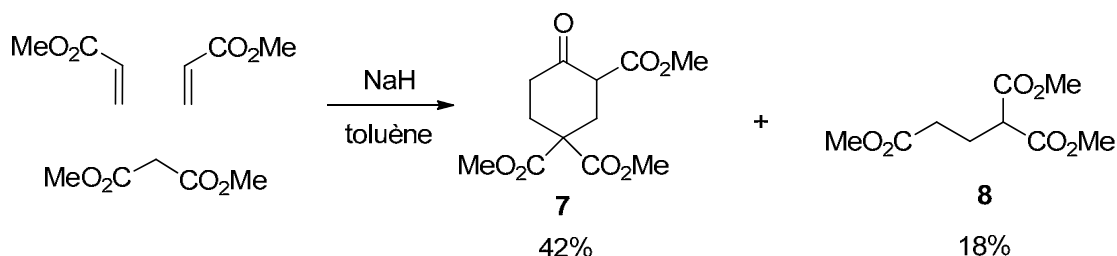


Schéma 94 : synthèse de la cyclohexanone **7**.

²³³ H. Sánchez, H. J. Flores *Synth. Commun.* **1985**, *15*, 141-149.

²³⁴ O. Z. Pereira, T. H. Chan *J. Org. Chem* **1994**, *59*, 6710-6716.

1.1.3.2 Hydrolyse et décarboxylation du composé 7

Nous avons essayé d'obtenir l'hydrolyse sélective d'un ester en position 1 en utilisant 2 équivalents de NaOH: En effet la formation de l'énolate de sodium pourrait permettre une protection de l'ester méthylique en position 3 (**schéma 95**). Ainsi après agitation pendant 24 heures à température ambiante en présence de deux équivalents de soude dans le MeOH, le milieu a été acidifié (pH = 2,5) et chauffé à reflux pendant 24 heures, aucun trace du composé **4** n'a pu être mise en évidence dans ces conditions (**schéma 95**). Compte tenu de ce résultat, nous avons choisi de ne pas poursuivre cette voie.

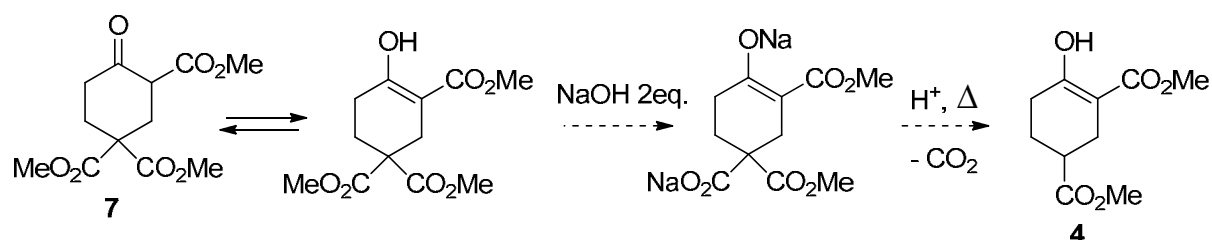


Schéma 95 : tentative de décarboxylation de la cyclohexanone 7.

1.1.3.3 Synthèse du 4-oxocyclohexane-1,1,3-tricarboxylate de 1-benzyle et de 1,3-diméthyle (9)

Nous avons ensuite envisagé la synthèse du composé **9** (**schéma 96**). En effet une hydrogénation catalytique devrait permettre une déprotection sélective de l'acide carboxylique en 1 et serait ensuite suivie d'une réaction de décarboxylation.

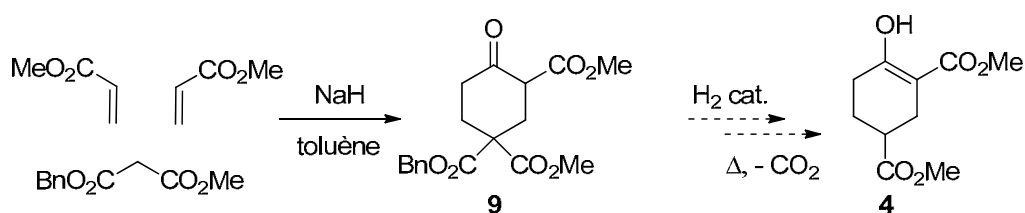


Schéma 96 : méthode hypothétique pour accéder au composé 4.

Le composé **9** a été obtenu avec un rendement de 46 % à partir de l'acrylate de méthyle et du malonate de benzyle et de méthyle suivant la méthode utilisée précédemment pour préparer le composé **7** (**schéma 97**). Ici encore le produit de monoaddition **10** a été isolé, mais aussi le produit de transestérification **7**. Nous avons, de plus, rencontré des difficultés de séparation des 3 produits par chromatographie. Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi de ne pas poursuivre nos efforts dans cette direction.

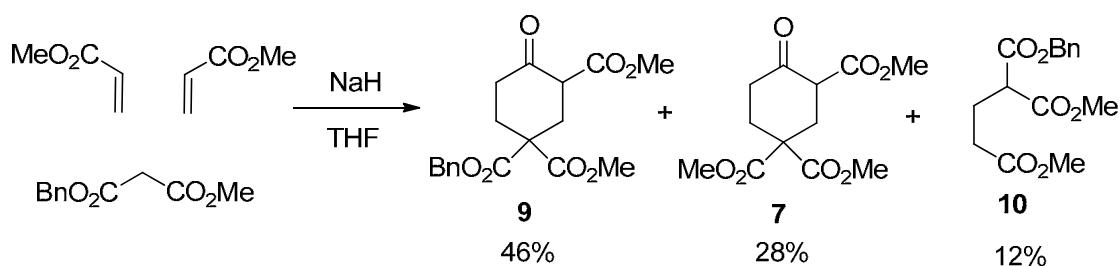


Schéma 97 : synthèse de la cyclohexanone 9.

1.1.3.4 Perspectives

Malgré l'échec rencontré avec la décarboxylation du composé 7, et la préparation du produit 9, le produit 7 pourrait donner accès à des céto-glutarates disubstitués en position 4 qui pourraient être décarboxylés avant l'étape de transamination (**schéma 98**).

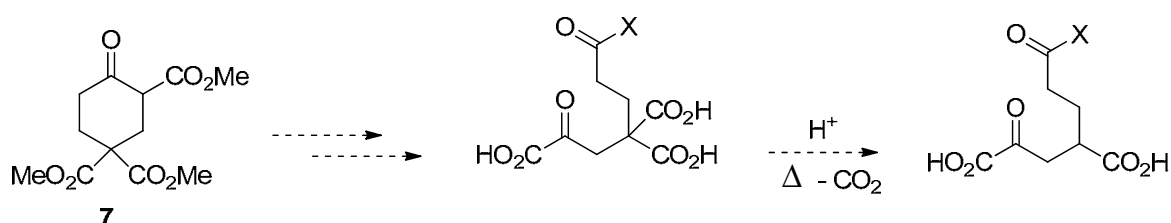


Schéma 98 : perspective d'utilisation du composé 7.

Cette méthode pourrait aussi donner accès à divers autres analogues du KG disubstitués en position 4 (**schéma 99**). En effet divers groupements attracteurs d'électron (NO₂, CN, Ar...) devrait permettre d'enchaîner les réactions de Michael et de Dieckmann et d'accéder aux céto-glutarates. Notons que la synthèse de la cyclohexanone avec le cyanoacétate (X = CN) est décrite dans la littérature avec un rendement d'environ 80%.²³⁵

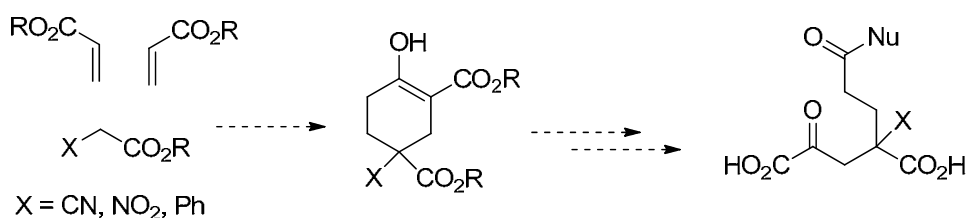


Schéma 99 : perspectives pour la synthèse d'analogues du KG disubstitués en position 4.

²³⁵ M. R. DeGraffenreid, J. A. Kaizerman, D. L. McMinn, Y. Rew, D. Sun, X. Yan, J. P. Powers *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 7455-7458.

1.2 Préparation des carbonates d'énol II

1.2.1 Synthèse des carbonates d'énol isobutyliques

La synthèse des carbonates d'énol a été réalisée à partir des cyclohexanones **4** et **6** en présence du chloroformate d'isobutyle (IBCF) et de triéthylamine. Après filtration et concentration du milieu réactionnel, l'analyse par RMN montre une pureté satisfaisante (> 90 %) du carbonate d'énol permettant son utilisation dans l'étape suivante sans purification. Nous avons cependant observé une bonne stabilité du carbonate d'énol vis-à-vis de la silice au cours d'un essai de purification.

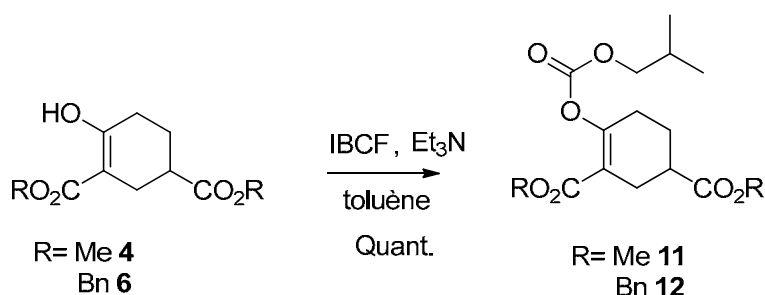


Schéma 100 : synthèse des carbonates d'énol **11** et **12**.

1.2.2 Synthèse du carbonate d'énol tertibutylique **13**

L'introduction d'un groupement BOC a été choisie afin d'assurer le succès de la transformation de l'anhydride mixte carbonique **16** en ester IV. En effet, l'alcool libéré à partir de l'anhydride (tertibutanol), de part son caractère encombré et peu nucléophile, n'entrera pas en compétition avec l'alcool (R'OH) utilisé pour la préparation des esters (schéma 101).

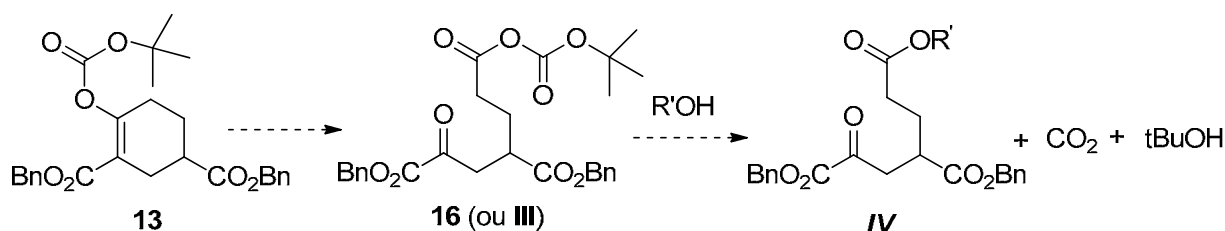
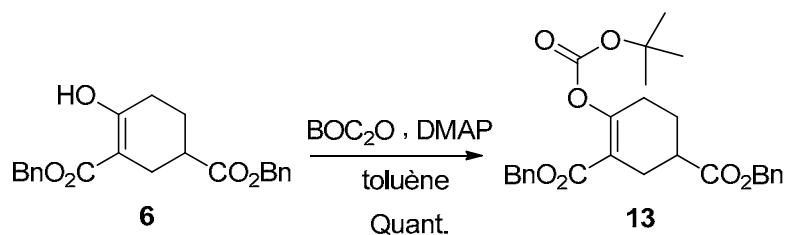


Schéma 101 : stratégie envisagée pour la formation des esters IV.

Le carbonate d'énol **13** a été obtenu après addition de di-tert-butyldicarbonate BOC₂O à une solution de cyclohexanone **6** dans le toluène en présence d'une quantité catalytique de DMAP. Le composé **13** a été isolé avec un rendement quantitatif et une très bonne pureté selon l'analyse RMN (schéma 102).

Schéma 102 : synthèse du carbonate d'énol **13**.

1.3 Synthèse des anhydrides mixtes carboniques III

Les carbonates d'énol ont été directement ozonolysés sans purification préalable. L'ozonolyse est effectuée dans CH_2Cl_2 anhydre à -78°C , elle est suivie d'une réduction en présence de sulfure de diméthyle (**schéma 103**). Ici encore une simple concentration a permis de mettre en évidence par RMN une très bonne pureté. Un essai de purification sur silice a cependant montré que ces dérivés ne résistent pas à ces conditions chromatographiques. A l'issue de l'ozonolyse, les anhydrides ont été conservés en solution et engagés directement dans l'étape suivante.

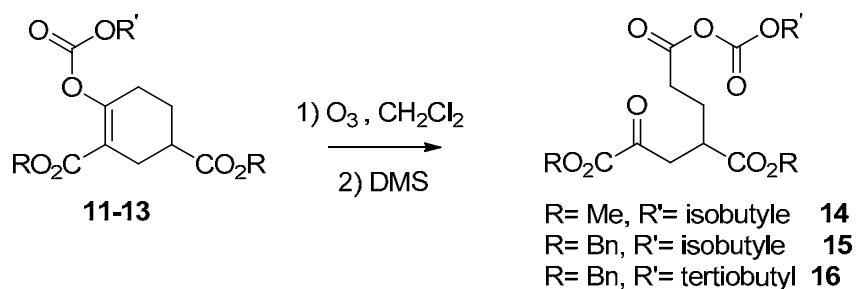


Schéma 103 : ozonolyse des carbonates d'énols.

Ces anhydrides mixtes ont permis, par la suite, la synthèse des différents analogues de KG fonctionnalisés en position 4 en réagissant de façon régiosélective, avec divers nucléophiles dont des alcools, des amines, des hydroxylamines...

1.4 Synthèse des amides 17-28

L'anhydride isobutylique **14** a été mis en réaction avec diverses amines. Des réactions parasites pouvant avoir lieu (attaque de l'amine sur la fonction cétone ou sur les esters méthyliques), nous avons choisi d'utiliser des quantités stœchiométriques d'amines. Différentes amines primaires et secondaires ont tout d'abord été utilisées. Après addition des amines à la solution d'anhydride mixte dans CH_2Cl_2 (**schéma 104**), on observe immédiatement un dégagement de CO_2 et la formation rapide des amides attendus.

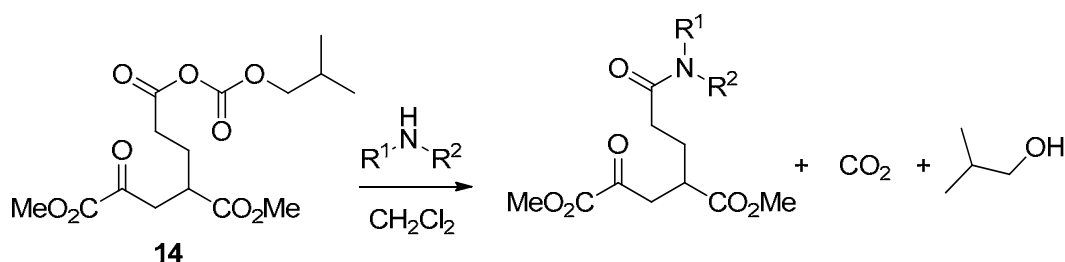


Schéma 104 : synthèse des amides.

1.4.1 Synthèse de l'amide 17

Le composé **17** a été obtenu selon deux méthodes. Dans la première, le chlorure d'ammonium a été utilisé comme source d'ammoniac: une solution de chlorure d'ammonium et de N,N-diisopropyléthylamine (DIEA) dans le DMSO a été préparée puis ajoutée à la solution d'anhydride **14**. La réaction a été arrêtée après 5 minutes. L'amide **17** a ainsi été obtenu avec un rendement de 52 % après purification sur gel de silice (**schéma 105**). Ce faible rendement peut s'expliquer par une perte du produit dans la phase aqueuse au cours de l'extraction du milieu, en raison de la polarité de la fonction amide primaire.

Pour éviter les problèmes rencontrés avec la première méthode, nous avons préparé une solution d'ammoniac dans le THF à partir d'ammoniac gaz. Après dosage de cette solution, nous avons additionné 1 équivalent de NH₃ au milieu contenant l'anhydride **14**. Le composé **17** a ainsi été obtenu après purification avec un rendement global de 84 % pour les 3 étapes à partir de la cyclohexanone **4** (**schéma 105**). Il est important de noter que le rendement obtenu pour l'amide **17** préparé précédemment par la méthode basée sur l'oxydation de l'énamine est de 41 %. Ce résultat démontre clairement l'efficacité de notre nouvelle approche.

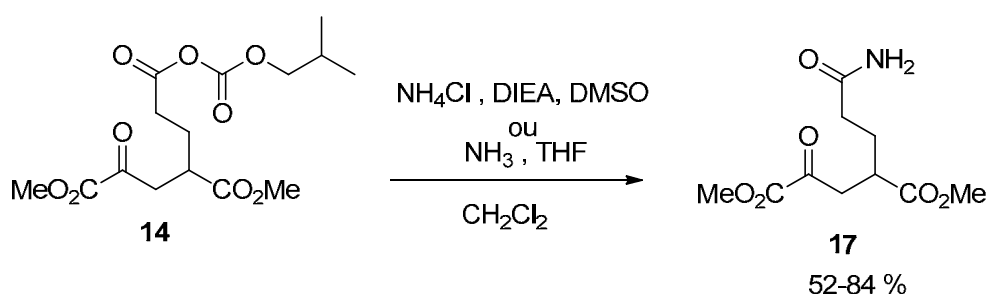


Schéma 105 : synthèse de l'amide 17.

1.4.2 Synthèse de l'amide 18

La préparation de l'amide **18** a été effectuée selon la première méthode utilisée pour la synthèse de l'amide **17** (**schéma 106**). Une solution de chlorure de méthylamine et de DIEA dans le DMSO a été ajoutée à la solution d'anhydride **14**, et le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 5 min. Une purification par chromatographie sur gel de silice a

permis d'isoler l'amide **18** avec un rendement global de 78 %, ce bon rendement peut sans doute être encore amélioré par l'utilisation de méthylamine en solution dans le THF.

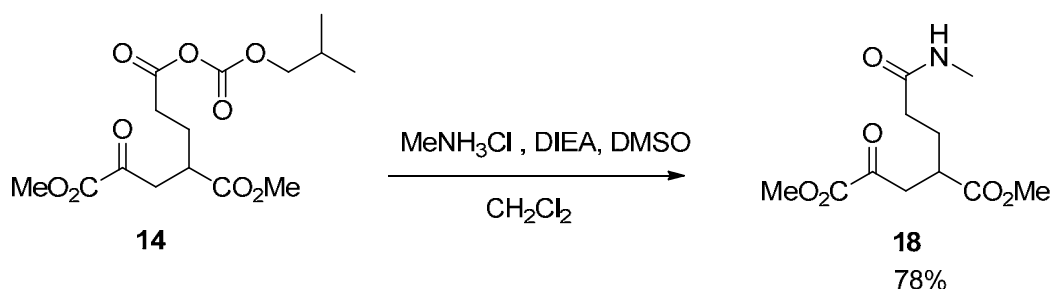


Schéma 106 : synthèse de l'amide **18**.

1.4.3 Synthèse de la série d'amides 19-23

Dans le cas de la série **19-23**, les différentes amines ont été ajoutées directement au milieu contenant l'anhydride **14**. Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus pour chacun des amides après purification par chromatographie sur gel de silice.

<p>14</p>	$\xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2]{\text{Amine HNR}^1\text{R}^2}$	<p>19-23</p>
Amine	Produit	Rendements (%)
	19	94
	20	90
	21	54
	22	83
	23	89

Tableau 12 : synthèse des amides **19-23**.

La réaction des amines avec l'anhydride **14** s'est donc avérée très chimiosélective et a permis d'atteindre des rendements bons à très bons. Le rendement modeste obtenu avec la diéthylamine correspond à un seul essai. Il est probablement accidentel et pourrait sans doute être amélioré en répétant cette synthèse.

1.4.4 Synthèse de la série d'amides 24- 28

Nous avons préparé de la même façon les amides présentant les groupements volumineux hydrophobes **24-28**, précurseurs des analogues du dérivé ES 322. Le tableau ci-dessous présente les différents rendements obtenus.

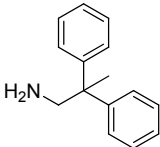
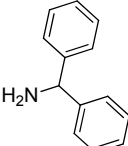
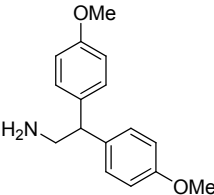
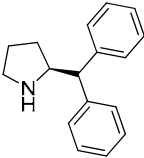
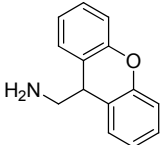
Amine	Produit	Rendements (%)
	24	79
	25	61
	26	78
	27	77
	28	79

Tableau 13 : rendements obtenus lors de la synthèse des amides **24-28**.

Toutes les amines utilisées sont commerciales à l'exception de la (9H-xanthen-9-yl)méthylamine **29** nécessaire pour préparer le cétoester **28**. Cette amine a été obtenue par réduction du 9H-xanthene-9-carboxamide réalisée en présence de LiAlH_4 dans un mélange toluène / Et_2O 1/1, après 24 heures de chauffage à reflux selon une méthode décrite dans la littérature.²³⁶ Après purification par chromatographie sur gel de silice, l'amine **29** a été obtenue avec un rendement de 64 % (**schéma 107**).

²³⁶ E. Filippatos, A. Papadaki-Valiraki, C. Roussakis, J.-F. Verbist *Arch. Pharm.* **1993**, 326, 451-456.

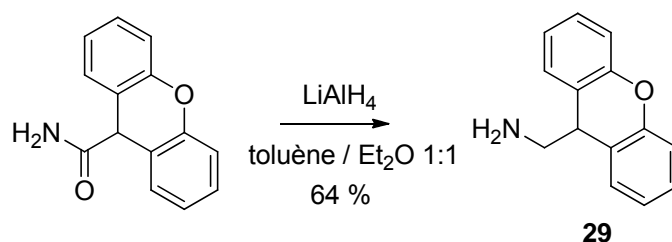


Schéma 107 : synthèse de la (9H-xanthen-9-yl)méthylamine **29**.

En parallèle, nous avons testé 3 types de condition de réduction de l'amide en changeant le réducteur et le solvant. Dans le premier nous avons essayé $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ comme réducteur.²³⁷ Après 24 heures de chauffage à reflux du THF, des traces de produit **29** ont été observées par RMN. Dans un deuxième essai nous avons utilisé LiAlH_4 dans le THF.²³⁸ Des traces de produits ont encore été obtenues. Enfin dans un troisième essai nous avons utilisé LiAlH_4 avec le toluène comme solvant. Un rendement de 20 % a été obtenu après chauffage à reflux du milieu réactionnel pendant une nuit.

1.5 Hydrolyse des cétoesters 17-28

La réaction d'hydrolyse des esters méthyliques a été effectuée dans des conditions très douces: les cétoesters **17-28** ont été saponifiés par une quantité stœchiométrique de LiOH 0,2 M dans un mélange $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 (schéma 108). Dans ces conditions, la réaction est quantitative après agitation à température ambiante pendant une nuit. Le très léger excès de LiOH est neutralisé en ajoutant une résine acide (Dowex H^+) jusqu'à l'obtention d'un pH de 7. Après filtration, le solvant est évaporé et les cétoacides sont isolés sous la forme de sels de lithium avec des rendements quantitatifs et de très bonnes puretés comme on peut en juger par analyse en RMN. Ces conditions ont permis de préserver les fonctions amides tout en évitant des réactions secondaires au niveau de la fonction cétone.

Nous avons ainsi pu synthétiser avec notre nouvelle méthode 12 nouveaux analogues du KG fonctionnalisés en position 4 par des amides. Cette méthode en 4 étapes à partir la cyclohexanone 4, nécessite une seule chromatographie (au niveau du cétoester) et a permis d'obtenir des rendements globaux de 54 à 94 %.

²³⁷ S. Nagarajan, B. Ganem *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4856-4861

²³⁸ E. J. Corey, M. J. Grogan *Org. Lett.* **1999**, *1*, 157-160.

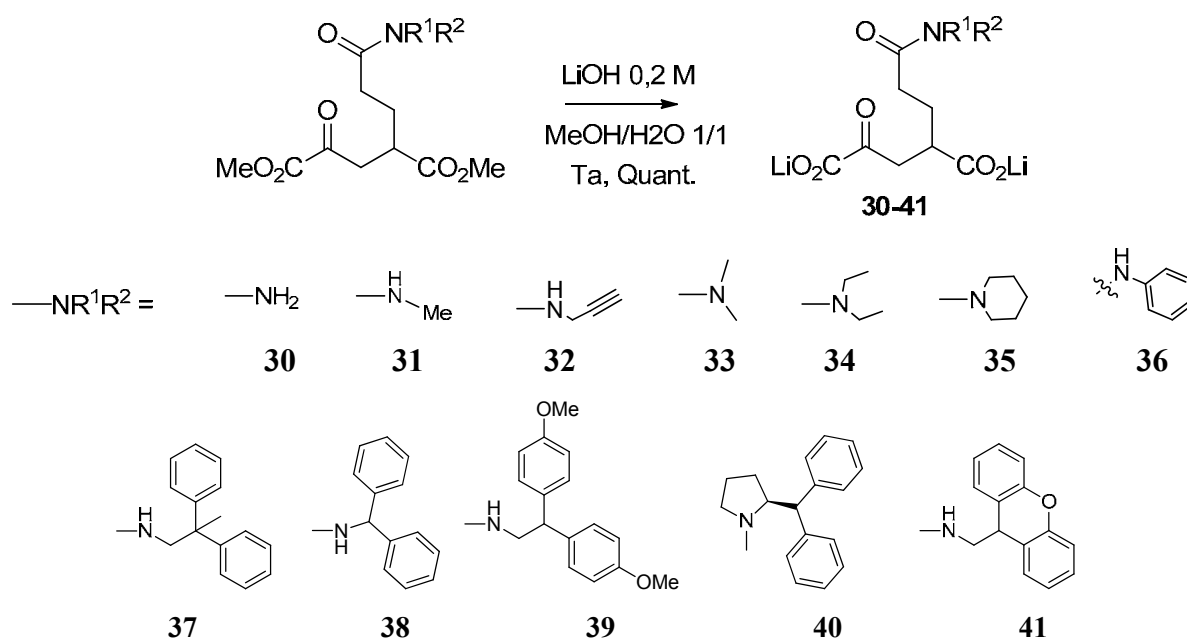


Schéma 108 : préparation des céto-glutarates 30-41.

1.6 Synthèse d'esters

Nous avons envisagé deux approches pour la synthèse des esters. La première consiste à utiliser l'anhydride mixte **15** et un excès d'alcool ($\text{R}'\text{OH}$) afin de limiter la compétition avec l'isobutanol libéré. La deuxième approche repose sur l'utilisation de l'anhydride mixte tertibutylique **16** et d'une quantité stœchiométrique d'alcool, en se basant sur le fait que le tertibutanol libéré est peu réactif pour attaquer l'anhydride.

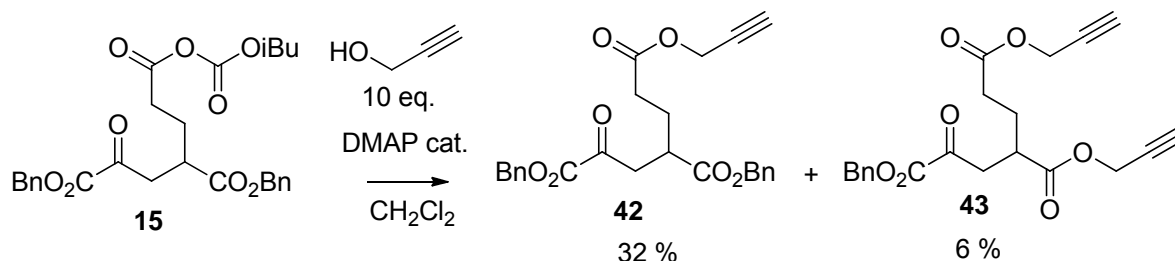
Pour évaluer l'efficacité des 2 approches nous avons préparé l'ester propargylique **42**.

1.6.1 Synthèse de l'ester propargylique 42

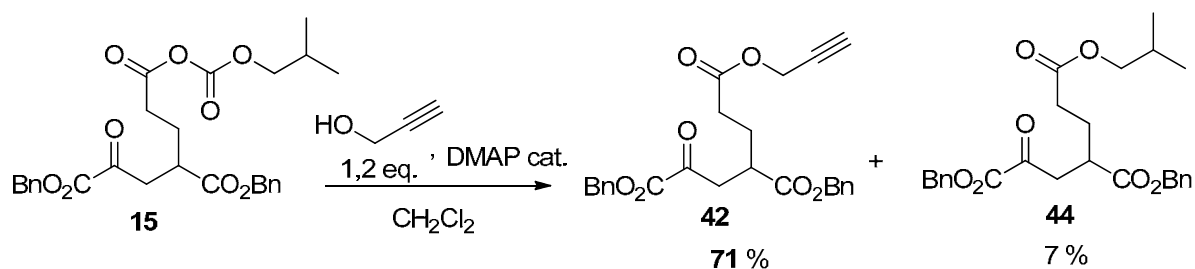
• Première approche

Dans un premier essai, 10 eq. d'alcool propargylique ont été ajoutés à la solution d'anhydride mixte **15**. Aucune réaction n'a eu lieu après agitation à température ambiante pendant 24 heures puis chauffage à reflux du CH_2Cl_2 pendant une nuit. Cependant après l'addition d'une quantité catalytique de DMAP, la disparition totale de l'anhydride a été observée après 5 minutes. La purification par chromatographie sur gel de silice a permis d'isoler l'ester propargylique **42** avec un rendement global de 32 % sur les trois étapes (formation du carbonate d'énol, ozonolyse, estérification). Nous avons aussi isolé le produit de transesterification **43** avec un rendement de 6 % (schéma 109). Dans cet essai, la

disparition de l'anhydride a été suivie par IR et le rendement annoncé est sous estimé en raison des pertes de produit lors de chaque mesure IR.

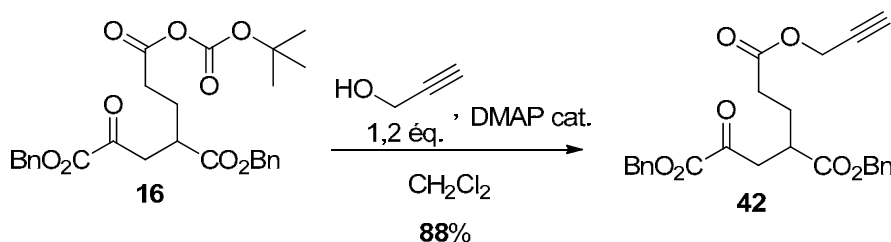


Dans un deuxième essai nous avons réalisé la synthèse avec 1,2 eq. d'alcool propargylique et avec la même quantité catalytique de DMAP. La réaction a été très rapide (quelques minutes). Nous avons obtenu dans ce cas après purification par chromatographie sur gel de silice, l'ester propargylique **42** avec un rendement de 71 % pour les trois étapes. Cependant nous avons aussi identifié l'ester isobutylique **44** formé avec un rendement de 7 % (**schéma 110**).



• Deuxième approche

Nous avons réalisé un troisième essai, en ajoutant comme précédemment 1,2 eq. d'alcool propargylique et du DMAP à une solution d'anhydride tertiobutylique **16**. Ici encore, la réaction a été très rapide. Nous avons isolé après purification uniquement l'ester propargylique avec un rendement global de **88%** (**schéma 111**).



Compte tenu des résultats obtenus aux cours des 3 essais réalisés, nous avons adopté pour la suite, la deuxième approche pour la préparation des esters aromatiques activés.

1.6.2 Synthèse des esters aromatiques activés

Comme nous l'avons déjà évoqué dans la présentation du projet, un des nos objectifs était la synthèse d'esters aromatiques activés. En effet ces composés pourraient servir de précurseurs pour la synthèse de séries d'analogues du Glu après la réaction de transamination (**schéma 112**).

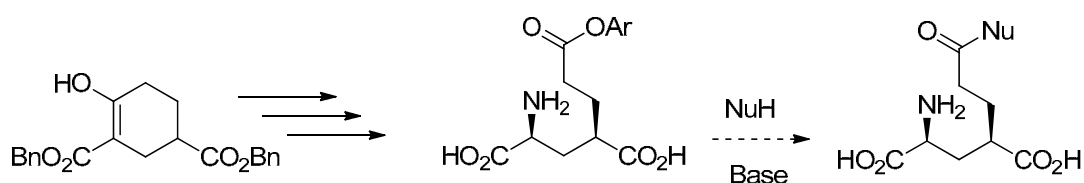


Schéma 112 : projet de synthèse et d'application d'esters activés.

Cette approche pose à l'évidence, un certain nombre de questions : il faut obtenir un ester suffisamment stable en milieu aqueux à pH neutre susceptible de subir sans dommage la réaction de transamination et conduisant à un analogue du Glu lui aussi suffisamment stable. La présence de la fonction amine dans la molécule constitue notamment un risque important. En effet le groupement $\alpha\text{-NH}_2$ peut compromettre la stabilité de l'ester activé via des réactions intra ou intermoléculaires mais aussi entrer en compétition avec les nucléophiles (NuH) utilisés lors de la réaction de dérivation.

Nous avons pensé que le choix judicieux du groupement OAr pourrait permettre d'obtenir un ester stable en milieu aqueux neutre en présence du groupement $\alpha\text{-NH}_2$ qui est alors sous la forme protonée non nucléophile. Nous avons aussi envisagé que la fonction amine pourrait être neutralisée par formation d'un complexe entre le motif α -aminoacide et des ions Cu^{2+} . Cette protection préalable pourrait alors permettre la réaction de l'ester activé avec divers nucléophiles.

La préparation des esters activés est une approche fréquemment utilisée pour la synthèse des peptides lorsque l'on souhaite ajuster la réactivité de l'espèce activé et éviter ainsi des réactions secondaires. Plusieurs dérivés du phénol sont classiquement utilisés pour la préparation des esters activés. La réactivité de ces esters dépend fortement de l'acidité du phénol (pK_a) qui est corrélée avec la qualité de groupe partant. L'ordre de réactivité des principaux dérivés du phénols utilisés est le suivant: pentafluorophénol ($\text{pK}_a = 5,49$) >

pentachlorophénol ($pK_a = 5,5$) > 2,4,6 trichlorophénol ($pK_a = 6,21$) > 2,4,5 trichlorophénol ($pK_a = 7,04$) > 4-nitrophénol ($pK_a = 7,14$).

Nous avons donc envisagé la préparation de plusieurs esters dans le but d'ajuster la balance stabilité / réactivité de nos dérivés du KG.

1.6.2.1 Synthèse des esters aromatiques activés **45**, **46** et **47**

La synthèse des esters aromatiques **45-47** a été réalisée en utilisant l'anhydride **16** avec 1eq. d'ArOH en présence d'une quantité catalytique de DMAP (**schéma 113**). Trois phénols (2,4,5 trichlorophénol, 4-nitrophénol et 4-hydroxybenzaldéhyde ($pK_a = 7,66$)) ont été utilisés. Le tableau ci-dessous présente les rendements obtenus après purification par chromatographie sur gel de silice pour chacun des esters aromatiques.

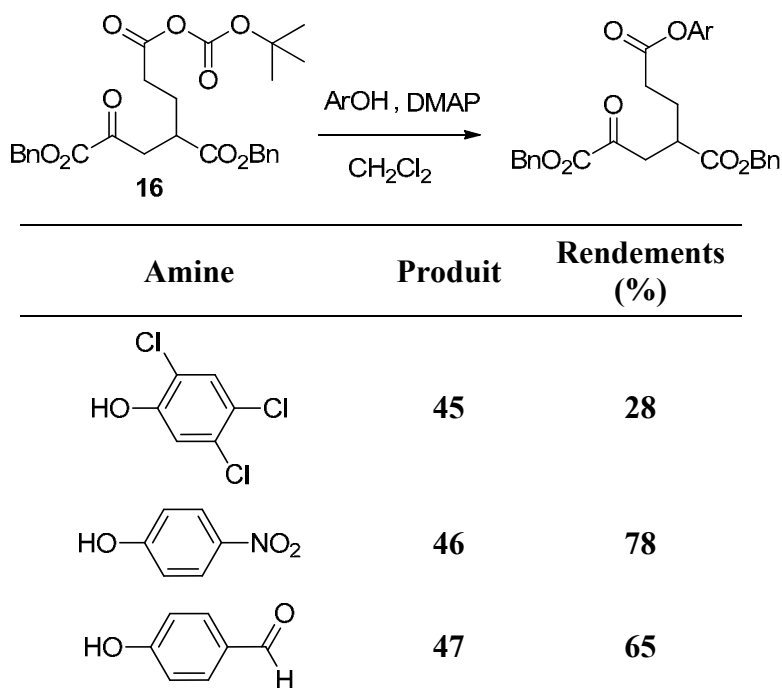


Schéma 113 : synthèse des esters activés aromatiques **45-47**.

L'analyse du milieu réactionnel avant purification montre pour les 3 expériences la présence majoritaire de l'ester aromatique. Cependant dans le cas du composé **45** un rendement de seulement 28 % a été obtenu après purification. Ceci s'explique logiquement par le fait que l'ester **45** a priori le plus réactif, est instable en présence de silice.

1.6.2.2 Déprotection des esters activés 45-47

Le clivage des esters benzyliques des composé **45-47** a été réalisé en présence de Palladium sur charbon dans le THF. Après filtration du catalyseur et évaporation du THF, le pH du milieu est ajusté à 7,6 par ajout de 2 équivalents de LiOH afin d'obtenir les cétoacides sous forme de sel de lithium. En effet il est important d'obtenir des cétoacides stables à pH 7,6 dans l'eau, car ce sont les conditions nécessaires pour réaliser la réaction de transamination avec l'AspAT.

Cas du composé **45** : La débenzylation a bien été observée, mais le produit s'est révélé instable dans l'eau à pH 7,6: seul le triacide **48** a pu être isolé après lyophilisation (schéma 114)

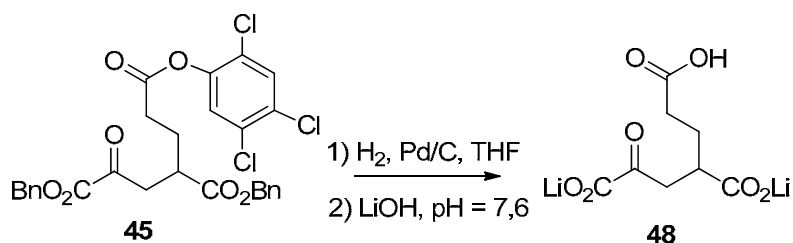


Schéma 114 : tentative de déprotection du composé **45**.

Cas du composé **46** : la réaction de débenzylation s'est dans ce cas accompagnée d'une réduction partielle du groupement nitro. Cette réaction était prévisible mais nous avions espéré que la débenzylation des esters serait beaucoup plus rapide et permettrait d'obtenir une déprotection sélective. De plus, ici encore, une instabilité du produit a été observée avec la formation de triacide **48** (schéma 115).

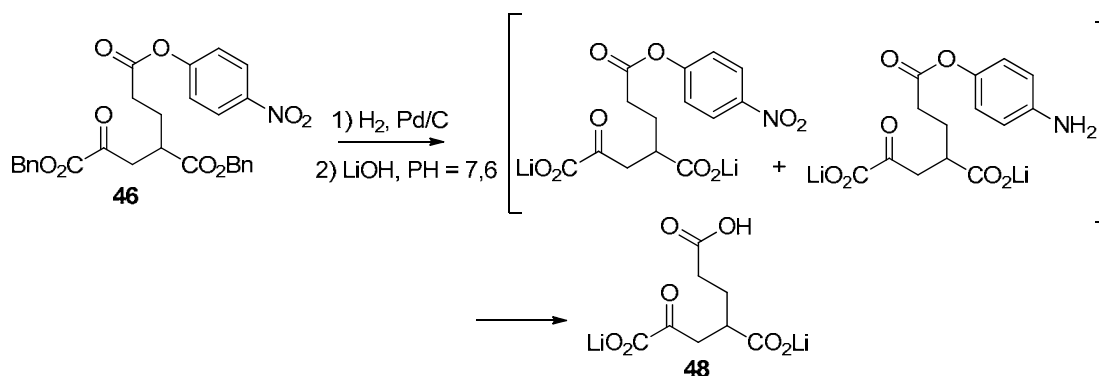


Schéma 115 : tentative de déprotection du composé **46**.

Cas du composé 47 : de nouveau, le clivage de groupement benzyle s'est accompagné, d'une réduction de l'aldéhyde et le produit s'est avéré instable dans l'eau à pH 7,6 (**schéma 116**).

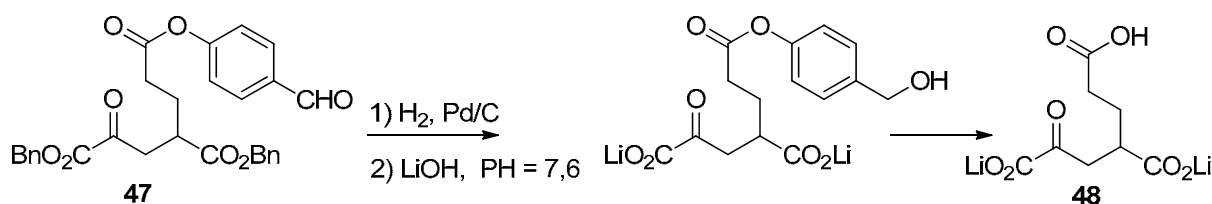


Schéma 116 : tentative de déprotection du composé 47.

1.6.2.3 Synthèse et déprotection de l'ester du catéchol 49

Nous avons effectué une dernière tentative avec la synthèse d'un ester du catéchol qui est décrit dans la littérature comme un précurseur efficace pour la synthèse des peptides.²³⁹ En effet, le catéchol possède un pKa de 9,85 et produit des esters relativement stable mais qui présentent des possibilités d'assistance anchimérique lors de l'aminolyse en milieu basique (**schéma 117**).²³⁶

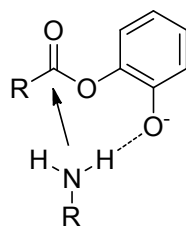


Schéma 117 : assistance anchimérique observée lors de l'aminolyse des esters du catéchol.

L'ester du catéchol a été synthétisé de la même façon que les esters aromatiques précédents. Après purification par chromatographie, le composé 49 a été isolé avec un rendement de 53 % (**schéma 118**).

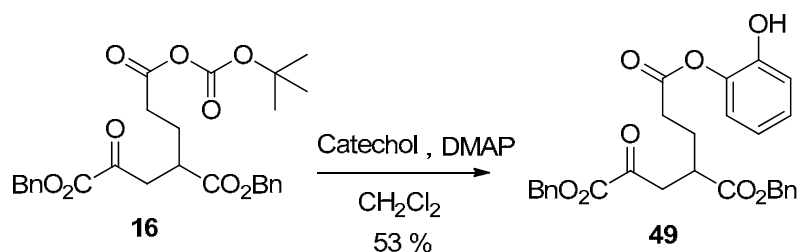


Schéma 118 : synthèse de l'ester du catéchol 49.

²³⁹ J. Verhaeghe, E. Lacassie, M. Bertrand, Y. Trudelle *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 461-464.

Comme dans le cas des esters aromatiques activés **45-47**, la formation du triacide **48** a été observée lors de la déprotection du composé **49**.

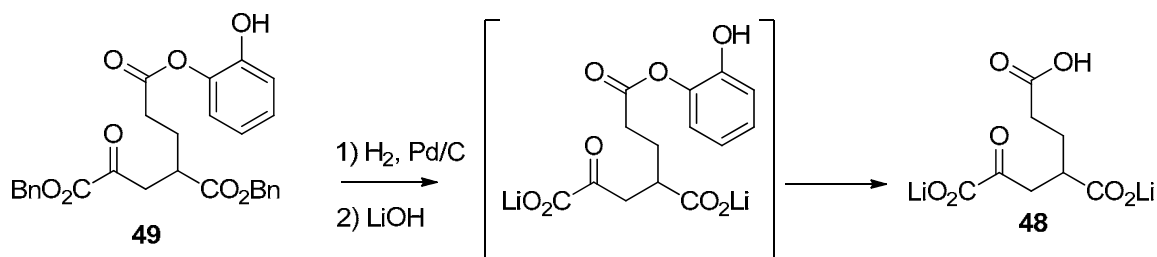


Schéma 119 : tentative de déprotection du composé **49**.

Compte tenu de ces résultats nous avons choisi de ne pas poursuivre cette approche et renoncé à la préparation des esters aromatiques activés.

1.6.3 Synthèse de l'ester méthylique **51**

L'ester méthylique **50** a pu être préparé en adoptant la même stratégie que précédemment. Ainsi, après ajout de MeOH (1.2 eq.) à la solution de l'anhydride mixte **16**, le milieu a été agité à température ambiante pendant une heure. Une purification par chromatographie sur gel de silice a permis d'obtenir l'ester **50** avec un rendement global de 76 % (schéma 120).

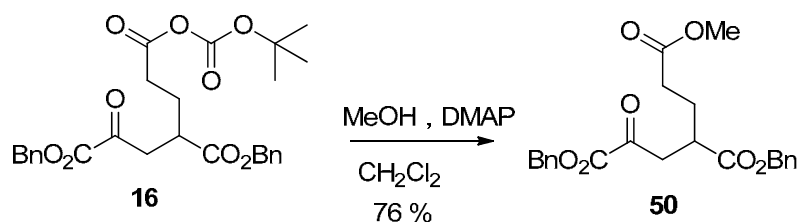


Schéma 120 : préparation de l'ester méthylique **50**.

L'hydrogénolyse des esters benzyliques a été réalisée en présence de charbon palladié dans le MeOH. Le cétoacide **51** a été obtenu avec un rendement quantitatif après avoir ajusté le pH à 7,6 par ajout de 2 équivalents de LiOH.

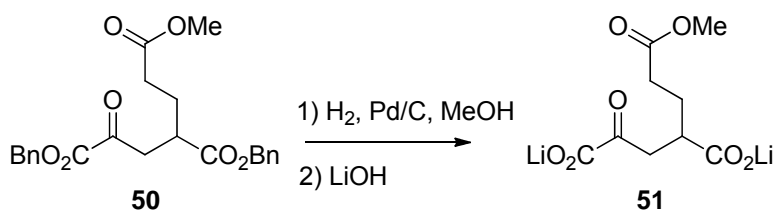


Schéma 121 : préparation du cétoacide **51**.

La synthèse du cétoacide **51** a été effectuée afin de préparer à nouveau l'analogue du Glu ES 284 (figure 49, page 139) et d'effectuer les tests fonctionnels pour déterminer son activité agoniste ou antagoniste. Le dérivé **51** avait été préparé précédemment selon une autre approche avec un rendement global de 40 % à partir de l'acétoacétate de benzyle et de l'itaconate de benzyle et de 5-méthyle. Le rendement global de 76 % obtenu dans notre cas montre encore l'efficacité de notre nouvelle méthode.

1.7 Synthèse d'hydrazide

En plus des amides et des esters, nous avons également envisagé la synthèse de dérivés hydrazides afin d'étendre la variété des analogues du KG.

1.7.1 Synthèse du 2-oxo-4-(3-oxo-3-(2-phénylhydrazinyl)propyl)pentanedioate de lithium (**53**)

Comme dans le cas des amides, l'hydrazide **52** a été obtenu par ajout de la phénylhydrazine au milieu contenant l'anhydride mixte isobutylique **14** (schéma 122). Le faible rendement obtenu est dû à la formation de produits indésirables suite à l'utilisation accidentelle d'un excès de phénylhydrazine (1,7 eq.). Une quantité stœchiométrique permet sans doute d'obtenir l'hydrazide **52** avec un meilleur rendement. L'analyse des spectres RMN de **52** dans le CDCl_3 et dans le DMSO deutéré, montre la présence de deux isomères correspondant sans doute à deux rotamères en équilibre dans un rapport 87/13 inséparables par chromatographie (schéma 122)

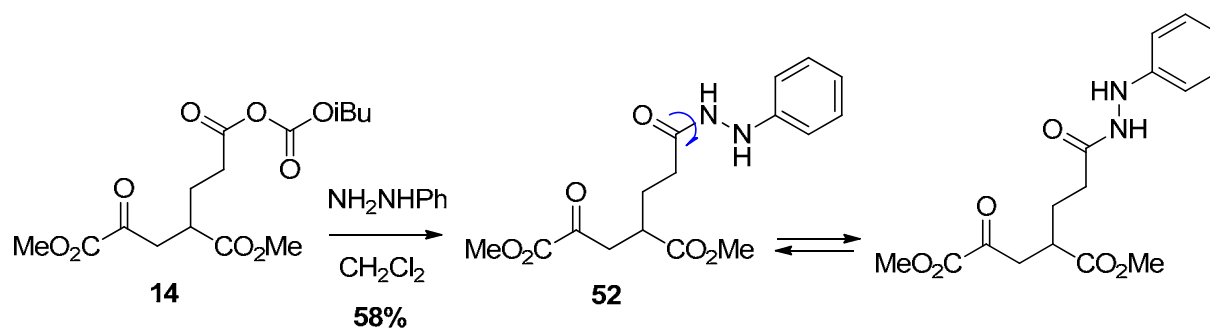


Schéma 122 : synthèse de l'hydrazide **51**.

Comme dans les cas des amides **17-28**, l'hydrolyse des esters méthyliques a été réalisée en présence d'une quantité stœchiométrique de LiOH. Le cétoacide **53** a été obtenu avec un rendement quantitatif (schéma 123). L'analyse par RMN dans D_2O a montré la présence d'une seule série de signaux ce qui traduit vraisemblablement une interconversion plus rapide des 2 rotamères après déprotection.

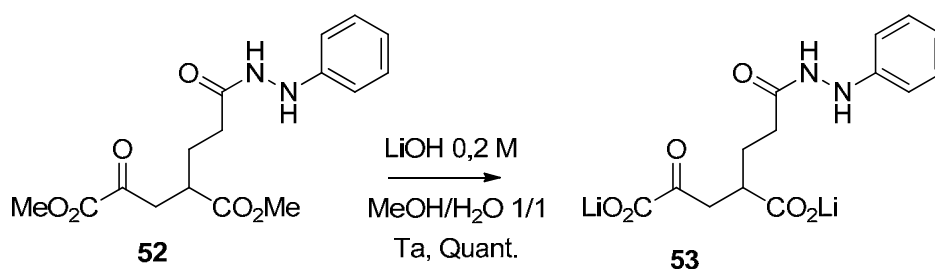


Schéma 123 : synthèse de l'hydrazide 53.

1.7.2 Préparation et déshydratation de l'acylhydrazide 54

Nous avons également étudié la synthèse de dérivés acyl hydrazides. En effet, ces composés peuvent être transformés en oxadiazole en présence d'une variété d'agents déshydratant (CBr_4 ²⁴⁰, P_2O_5 ²⁴¹, TsCl ²⁴², POCl_3 ²⁴³, réactif de Burgess^{244 245}) offrant ainsi l'accès à de nouvelles structures (schéma 124).

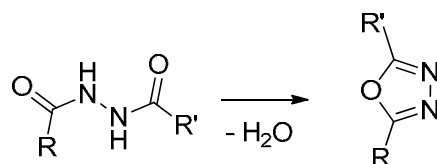


Schéma 124 : synthèse d'oxadiazoles par déshydratation d'acyl-hydrazides.

La synthèse de l'acyl-hydrazide 54 a été réalisée par l'ajout de benzohydrazide au milieu réactionnel contenant l'anhydride mixte isobutylique 14 dans le CH_2Cl_2 . Après purification par chromatographie, le composé 54 a été isolé avec un rendement de 43 % (schéma 125).

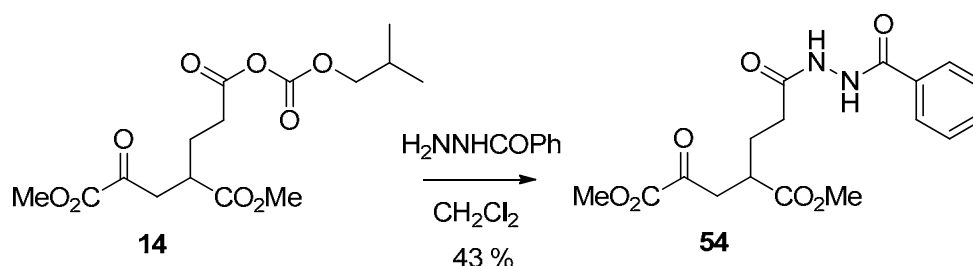


Schéma 125: synthèse du composé 54.

²⁴⁰ H. A. Rajapakse, H. Zhu, M. B. Young; B. T. Mott *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 4827-4830

²⁴¹ D. Alker, R. A. Burges, A. J. Carter, D. G. Gardiner *J Med Chem.* **1989**, 32, 2381-2388.

²⁴² G. I. Elliott, D. L. Boger *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10589-10595.

²⁴³ Y.-G. Wang; X. Huang; Y.-Z. Wu *Tetrahedron* **2007**, 63, 7866-7873.

²⁴⁴ D. C. Pryde, S. Planken, C. Kohl; K. Beaumont, S. Coggon, M. Tute *J Med Chem.* **2006**, 49, 4409-4424

²⁴⁵ C. T. Brain, J. M. Paul, Y. Loong, P. J. Oakley *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3275-3278.

La déshydratation du composé **54** a été effectuée en présence de CBr_4 et de PPh_3 dans CH_2Cl_2 . L'oxadiazole **55** a été obtenu avec un rendement de 51 %. L'analyse par RMN du proton, montre la disparition des doublets correspondant aux NH, l'analyse du spectre RMN ^{13}C indique la présence de 2 pics caractéristiques du cycle oxadiazole vers 165 ppm (**schéma 126**).

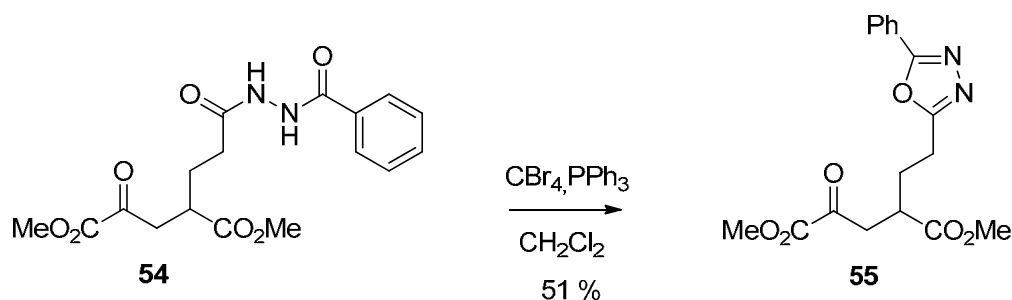


Schéma 126: déshydratation de l'acyl-hydrazide **54**.

Bien que le rendement soit pour l'instant modeste, il apparaît donc possible de préparer une nouvelle série de dérivés d'analogues du KG. Ce résultat démontre encore l'intérêt de l'utilisation de l'intermédiaire anhydride mixte qui permet une réaction chimiosélective avec une variété de nucléophiles.

1.7.3 Préparation et déshydratation de l'acyl hydrazide **57**

Nous avons envisagé la synthèse d'un dérivé oxadiazole qui serait un analogue du composé ES 322 (**schéma 127**).

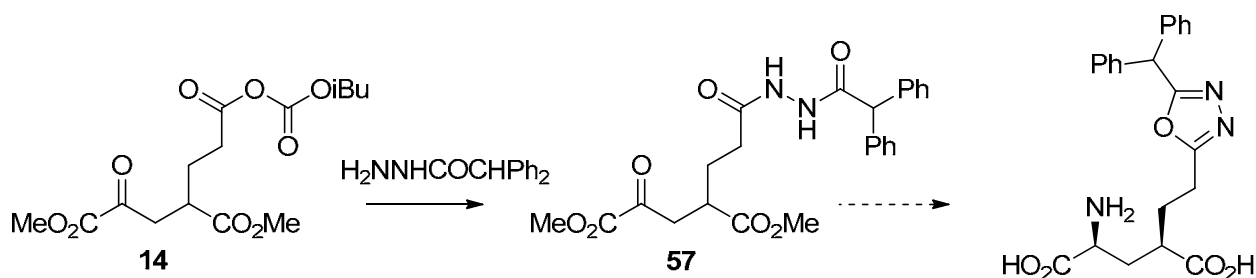


Schéma 127: stratégie pour la préparation d'un oxadiazole analogue à ES 322.

Le 2,2-diphénylacétohydrazide **56** nécessaire pour la synthèse de l'acyl hydrazide **57** n'étant pas commercial, il a été simplement obtenu avec un rendement de 52 % par réaction entre l'hydrazine et le chlorure de diphenylacétyle (**schéma 128**).

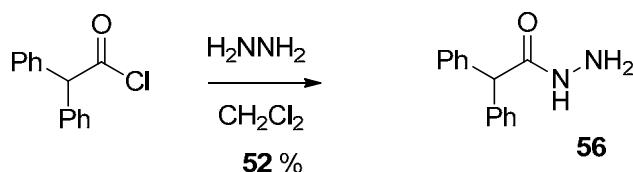


Schéma 128: synthèse de l'hydrazide **56**.

La synthèse de l'acyl hydrazide **57** a été réalisée sans difficulté, par addition du 2,2-diphenylacétohydrazide **55** au milieu contenant l'anhydride **14**. Le produit **57** a été isolé après chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 53 %.

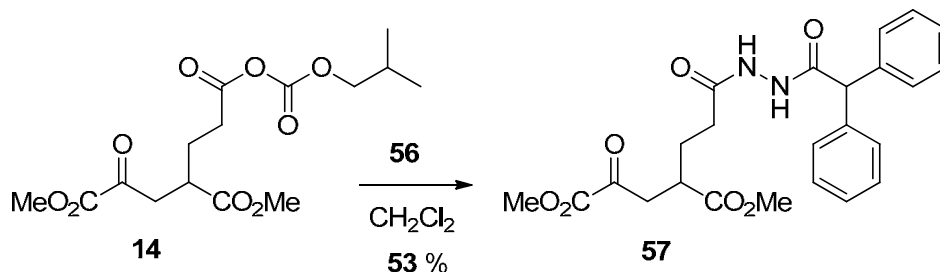


Schéma 129: synthèse de l'acyl hydrazide **57**.

Deux tentatives de déshydratation ont été effectuées: dans la première, nous avons reproduit les conditions de déshydratation mises en œuvre pour la synthèse du composé **55**. L'analyse par RMN ^1H du milieu réactionnel après concentration a montré la disparition des signaux correspondant aux NH. Cependant, après purification par chromatographie, des produits de dégradations difficiles à analyser, ont été obtenus. Nous avons ensuite réalisé un deuxième essai en utilisant comme agent de déshydratation le réactif de Burgess.²⁴⁴ Ce dernier présente l'avantage d'être éliminé du milieu plus simplement par extraction. Après l'ajout du réactif du Burgess au milieu contenant l'acyl-hydrazide **57** dans le THF, le milieu réactionnel a été chauffé à reflux pendant 16 heures. L'analyse du spectre RMN ^1H a montré aussi la formation de produits de dégradations difficiles à analyser. Par manque de temps nous n'avons pas poursuivi cette synthèse.

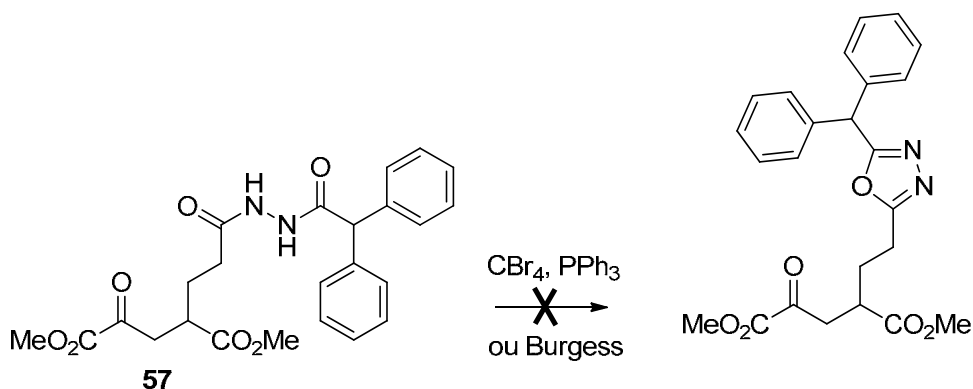


Schéma 130: tentative de déshydratation du composé **57**.

1.8 Synthèse d'hydroxamates

Les dérivés hydroxamates envisagés sont intéressants à double titre: ce sont des analogues des amides ES 287 et ES 319 qui ont montré une affinité et une sélectivité vis-à-vis des KARs, mais aussi de l'acide ES 241 qui se comporte comme un agoniste des mGluRs du groupe II (**figure 49**, page 139).

1.8.1 Synthèse du 2-(3-(hydroxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle (**58**)

Nous avons réalisé la synthèse selon la même méthode utilisée pour la synthèse des amides, en ajoutant l'hydroxylamine au milieu contenant l'anhydride mixte **14**. Plusieurs essais ont été effectués. Nous avons tout d'abord utilisé une solution aqueuse d'hydroxylamine obtenue par neutralisation du chlorhydrate d'hydroxylamine par de la soude. Après addition à la solution d'anhydride **14**, le milieu biphasique a été agité à température ambiante pendant une nuit. Après purification par chromatographie, nous avons isolé majoritairement le dimère **59** (identifié par RMN et spectrométrie de masse), ainsi que divers produits de dégradation.

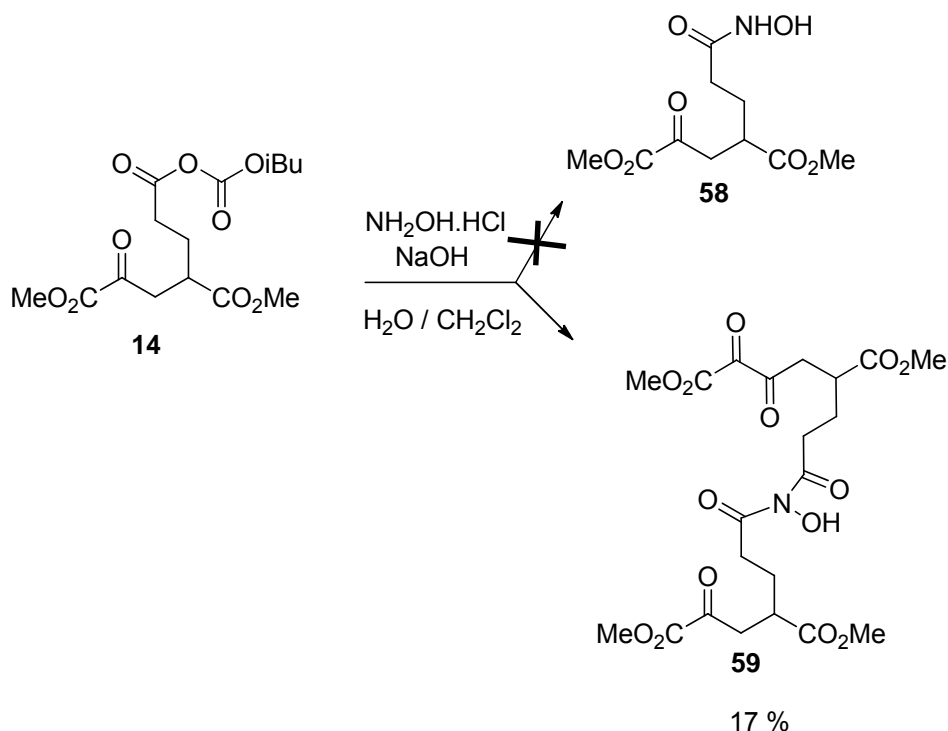


Schéma 131: première tentative de synthèse du composé **58**.

Dans un deuxième essai, nous avons ajouté du THF afin d'assurer une homogénéité du milieu réactionnel. Après purification par chromatographie, nous avons isolé l'hydroxamate **58** avec un rendement de 27 %, et le dimère **59** avec un rendement de 16 %. Dans un

troisième essai, une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine et de N,N diisopropyléthylamine (DIEA) dans du DMSO a été utilisée. Un dégagement gazeux a été observé et la réaction a été arrêtée après 5 minutes. L'analyse par RMN ^1H après concentration du milieu réactionnel, a montré la présence quasi-exclusive de l'hydroxamate **58**. Cependant après purification par chromatographie, nous avons isolé le composé **58** avec un rendement de seulement 52 % accompagné d'une légère quantité de dimère **59** (5 %), nous avons ainsi constaté une certaine instabilité de l'hydroxamate **58** qui se dimérise pour donner le composé **59**.

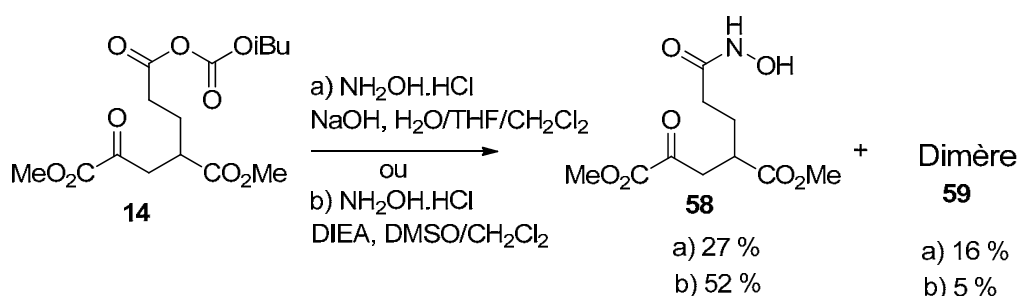


Schéma 132: synthèse d'hydroxamate **58**.

Compte tenu des résultats obtenus et de l'instabilité de l'hydroxamate **58**, une protection de l'hydroxylamine a été envisagée.

1.8.2 Synthèse du 2-(3-(tert-butoxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle (**60**)

L'utilisation de l'O-(tert-butyl)hydroxylamine a permis d'isoler le composé **60** après purification par chromatographie avec un rendement de 59 % (schéma 133). L'analyse par RMN dans le CDCl_3 a montré la présence de deux rotamères dans un rapport 64/36. Il est à noter que l'O-(tert-butyl)-hydroxylamine est commerciale sous la forme de chlorhydrate et que la solution de O-(tert-butyl)hydroxylamine a été obtenue par extraction après neutralisation à pH = 8 d'une solution aqueuse de chlorhydrate.

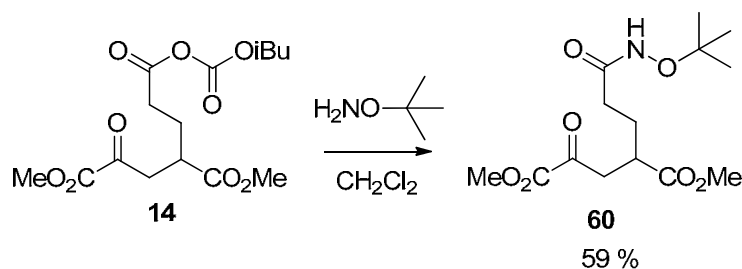


Schéma 133: synthèse de l'hydroxamate **60**.

1.8.3 Synthèse du 2-(3-(benzyloxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle (61)

La protection avec le groupement benzyle a aussi été envisagée. En effet celui-ci doit pouvoir être déprotégé sélectivement par hydrogénation avec un risque mineur de couper la liaison N-O. Ainsi selon le même procédé que précédemment, l'hydroxamate **61** a été obtenu avec un rendement de 59 %. Ici encore, l'analyse par RMN dans le CDCl_3 a montré la présence de 2 rotamères dans un rapport 73/27.

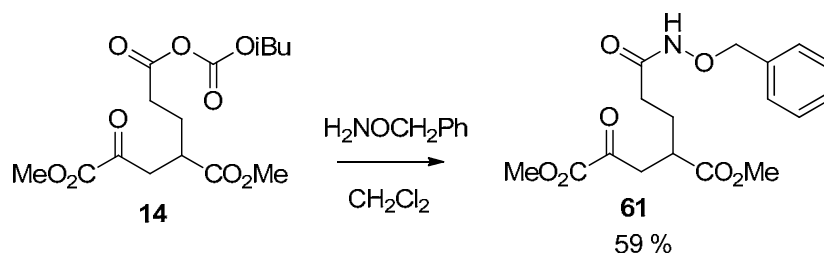


Schéma 134: synthèse de l'hydroxamate **61**.

1.8.4 Synthèse du 2-(3-(hydroxy(méthyl)amino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle (62)

L'hydroxamate **62** a été obtenu en additionnant une solution de chlorhydrate de N-méthylhydroxylamine et de DIEA dans le DMSO, à une solution d'anhydride **14**. Après purification par chromatographie l'hydroxamate **62** a été obtenu avec un rendement de 52 %. Ce faible rendement est encore dû à une dégradation sur la silice du produit qui a conduit à des mélanges de produits indésirables et difficiles à analyser. Comme pour les composés **60** et **61** l'analyse par RMN dans le CDCl_3 a montré la présence de deux rotamères dans un rapport 60/40.

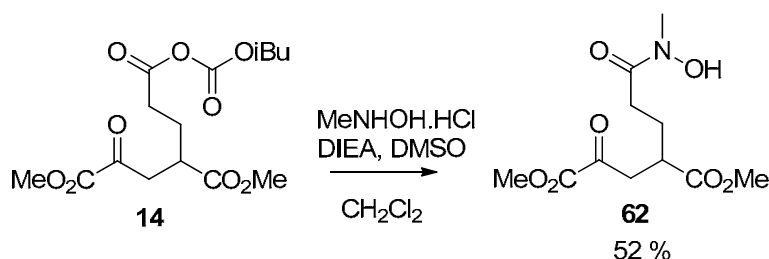
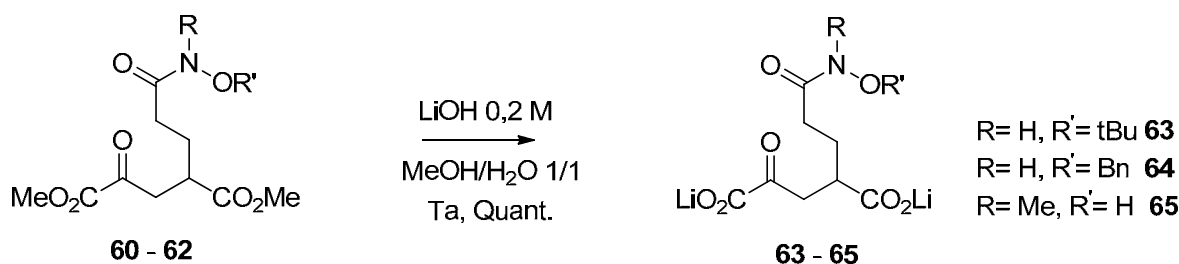


Schéma 135: synthèse du composé **62**.

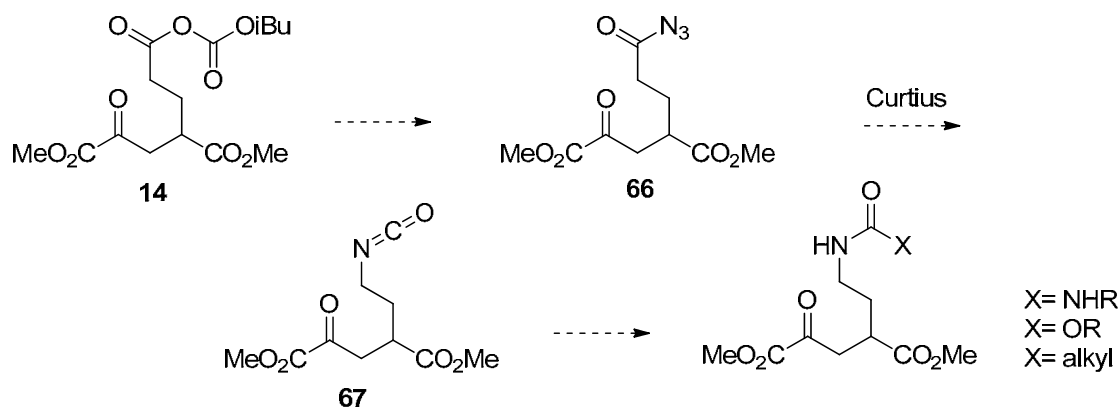
1.8.5 Hydrolyse des cétoesters 60-62

L'hydrolyse des esters méthyliques a pu être réalisée sélectivement en présence d'une quantité stœchiométrique de LiOH comme dans le cas des composés **17-28**. Une seule série de signaux a été obtenue pour les cétoacides **63** et **64**, tandis que 2 isomères ont encore été observés par RMN dans D_2O pour le composé N-méthylé **65**.

Schéma 136: hydrolyses des cétoesters **60-62**.

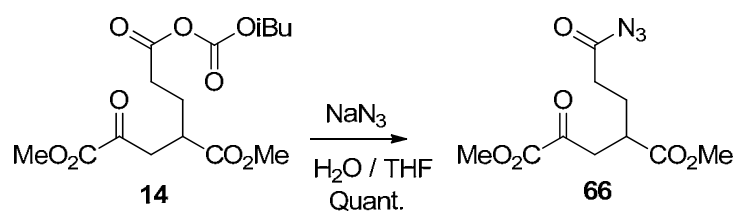
1.9 Synthèse et applications d'un isocyanate

Nous avons envisagé de préparer un isocyanate à partir de l'anhydride via le réarrangement de Curtius d'un intermédiaire azoture d'acyle. En effet, cet isocyanate pourrait donner accès à plusieurs séries de dérivés : carbamates, urées, ou encore amides par réaction avec des alcools, des amines ou encore des acides carboxyliques (**schéma 137**).

Schéma 137: synthèse et application de l'isocyanate **67**.

1.9.1 Synthèse de l'azoture d'acyle **66**

Le composé **66** a été obtenu par réaction entre l'anhydride mixte **14** et l'azoture de sodium. Nous avons utilisé une méthode décrite dans la littérature qui consiste à ajouter une solution de NaN_3 dans l'eau au milieu contenant l'anhydride dans le THF à -10°C .²⁴⁶ Le composé **66** a été isolé, après filtration et concentration, avec une bonne pureté attestée par RMN (**schéma 138**).

Schéma 138: synthèse du cétoester **66**.

²⁴⁶ V. V. Sureshbabu, B. S. Patil, R. Venkataramanarao *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7697-7705.

1.9.2 Préparation de l'isocyanate 67

L'isocyanate a aussi été obtenu avec une bonne pureté à partir du l'azoture **66**, via le réarrangement de Curtius. Celui-ci est observé après chauffage à reflux du CH_2Cl_2 pendant 24 heures. L'isocyanate a ensuite été engagé directement dans les réactions suivantes sans purification préalable. L'isocyanate a donc été obtenu à partir de la cyclohexanone **4** en quatre étapes et sans aucune purification par chromatographie.

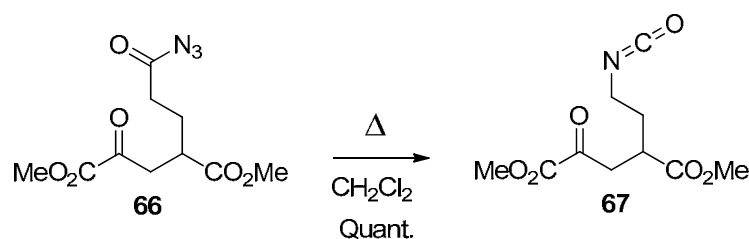


Schéma 139: synthèse de l'isocyanate **67**.

1.9.3 Synthèse et déprotection du carbamate benzylique 68

Nous avons choisis de faire réagir l'isocyanate **67** avec l'alcool benzylique. En effet, cet alcool permet d'accéder au carbamate benzylique (groupement Z) qui est un groupement protecteur d'amine facile à éliminer.

La préparation des carbamates à partir d'isocyanates et d'alcools est bien décrite dans la littérature. Elle consiste à chauffer à reflux un mélange d'isocyanate et d'alcool dans un solvant organique. Nous avons effectué un premier essai, en chauffant pendant 3 jours à 80°C un mélange d'isocyanate **67** et de BnOH dans le toluène. La disparition de l'isocyanate a été suivie par IR. Nous avons isolé le composé **68** sous sa forme cyclique avec un rendement de 45 % (schéma 140). Ce faible rendement est dû à la formation de différents produits de dégradation de l'isocyanate au cours de cette réaction de longue durée. Il est à noter que l'analyse par RMN et LC/MS du carbamate cyclique **68**, montre la présence des deux isomères *cis* et *trans* en équilibre. Contrairement à ce qui avait été observé précédemment dans le cas de l'amide ES 145 (voir partie biblio, schéma 71, page 111), cet équilibre est assez rapide et ne permet pas la séparation par chromatographie sur gel de silice.

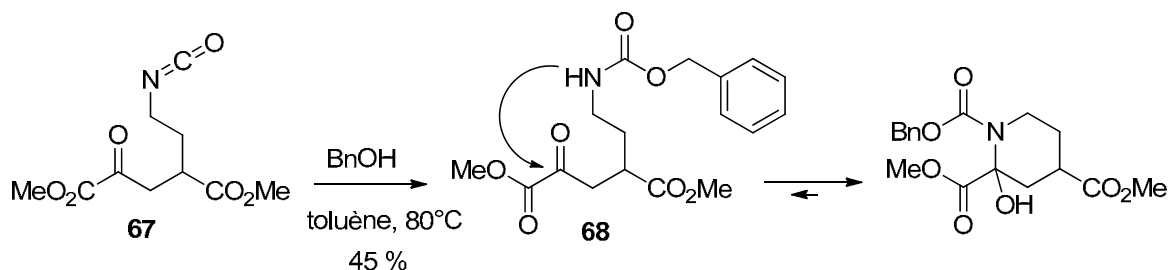


Schéma 140: synthèse du carbamate **68**.

Dans le but de diminuer le temps de réaction et d'améliorer le rendement, nous avons effectué un deuxième essai en activant la réaction par irradiation microonde. Nous avons bien remarqué la disparition plus rapide de l'isocyanate après 9 heures, mais le carbamate cyclique a été isolé avec un rendement de seulement 11 % après purification par chromatographie sur gel de silice.

Nous avons reproduit dans un troisième essai, une méthode décrite dans la littérature et qui consiste à utiliser l'APTS afin de catalyser la réaction.²⁴⁷ Nous avons observé la disparition de l'isocyanate après deux heures mais celle-ci s'accompagne de la formation d'un mélange de nombreux produits difficiles à caractériser.

Par manque de temps, nous n'avons pas poursuivi l'étude d'optimisation de la synthèse du carbamate. D'autres essais restent à faire, notamment en utilisant le DABCO.²⁴⁸

Après hydrolyse des esters méthyliques en présence de lithine, l'analyse RMN dans D₂O, a montré, en plus des deux isomères cycliques, la présence de la forme linéaire qui représente 68 % du mélange (**schéma 141**).

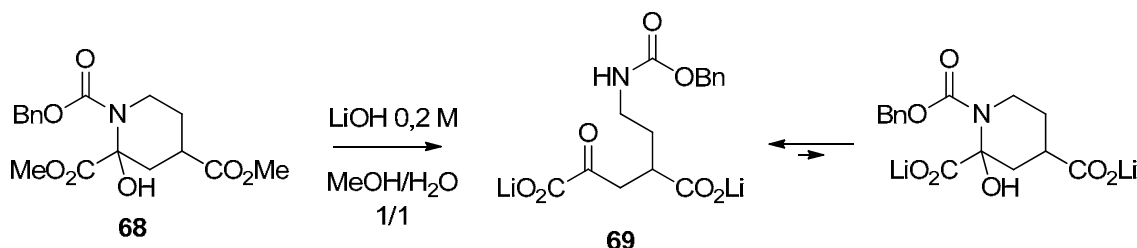


Schéma 141: hydrolyse du cétoester **68**.

Le cétoacide permet d'envisager la préparation d'un nouvel analogue diaminé du Glu protégé sélectivement qui pourrait servir de précurseur pour la synthèse de plusieurs analogues du Glu, (**schéma 142**) ce qui constitue un de nos objectifs évoqué dans la présentation du projet.

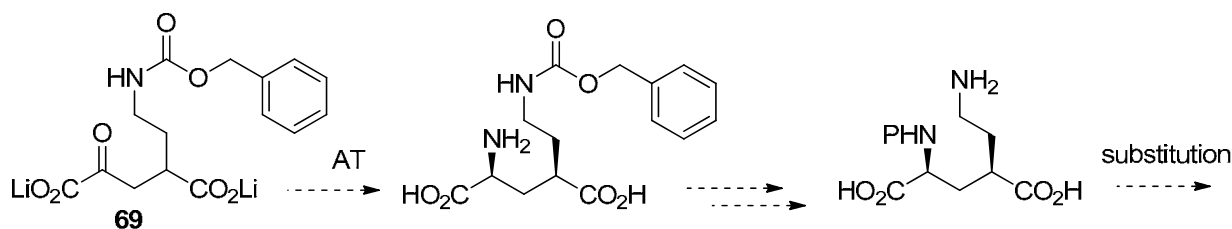


Schéma 142: intérêt du cétoacide **69**.

²⁴⁷ J. Altman, D. Ben-Ishai, W. Beck *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 887-894.

²⁴⁸ O. Ouari, A. Polidori, B. Pucci, P. Tordo, F. Chalier *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 3554-3556.

1.9.4 Préparation d'urées et d'amides

Comme nous l'avons déjà évoqué, la réaction des isocyanates avec différentes amines ou différents acides, peut donner accès à des séries d'urées et d'amides.

1.9.4.1 Réaction de l'isocyanate **67** avec la propargylamine

Pour accéder à des urées, un seul essai a été réalisé avec la propargylamine. Cette dernière a été ajoutée à une solution d'isocyanate dans le CH_2Cl_2 . Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 7 heures, nous n'avons pas isolé l'urée attendue mais nous avons pu caractériser le composé cyclique **70** isolé avec un rendement de 61 %. Ce composé s'est formé via une double cyclisation comme le montre le schéma 143. Compte tenu de ce résultat nous n'avons pas poursuivi dans la voie de synthèse des urées.

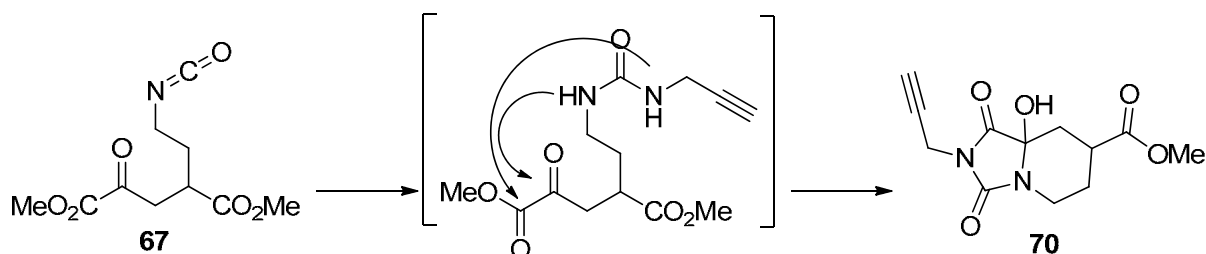


Schéma 143: réaction entre l'isocyanate **67** et la propargylamine.

Le composé **70** correspond cependant à une structure originale qui pourrait servir de base pour la conception d'une chimiothèque exploitable en chimie médicinale

1.9.4.2 Réaction de l'isocyanate **67** avec l'acide acétique

Une seule tentative a été réalisée pour la synthèse d'amides en présence de DMAP, comme cela est décrit dans la littérature (schéma 144).^{249, 250} Après agitation à température ambiante pendant 2 heures, un mélange de produits complexe et difficile à analyser a été obtenu.

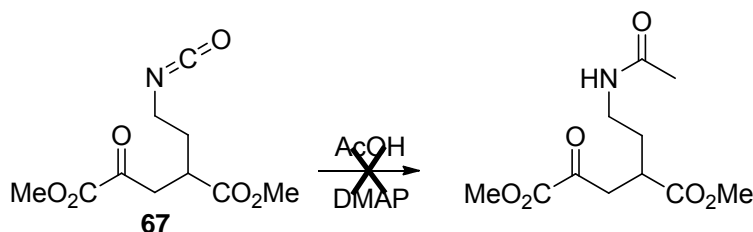


Schéma 144: tentative de synthèse d'un amide à partir de l'isocyanate **67** et l'acide acétique.

²⁴⁹ J. Altaian, B. Wolfgang *Tetrahedron* **1995**, 51, 13309-13320.

²⁵⁰ A. C. Schuemacher, R. W. Hoffmann *Synthesis* **2001**, 2001, 243-246

D'autres conditions doivent encore être testées comme l'utilisation de $\text{Et}_3\text{N}^{251, 252}$, mais par manque de temps, nous n'avons pas poursuivi cette approche.

1.10 Essai de synthèse d'une diazocétone

Nous avons envisagé la synthèse d'une diazocétone afin d'accéder à une variété de céto-glutarates. En effet la fonction diazocétone donne accès à diverses structures comme des cétones α -hydroxylés ou encore des amides et des esters après un réarrangement de Wolff (schéma 145).

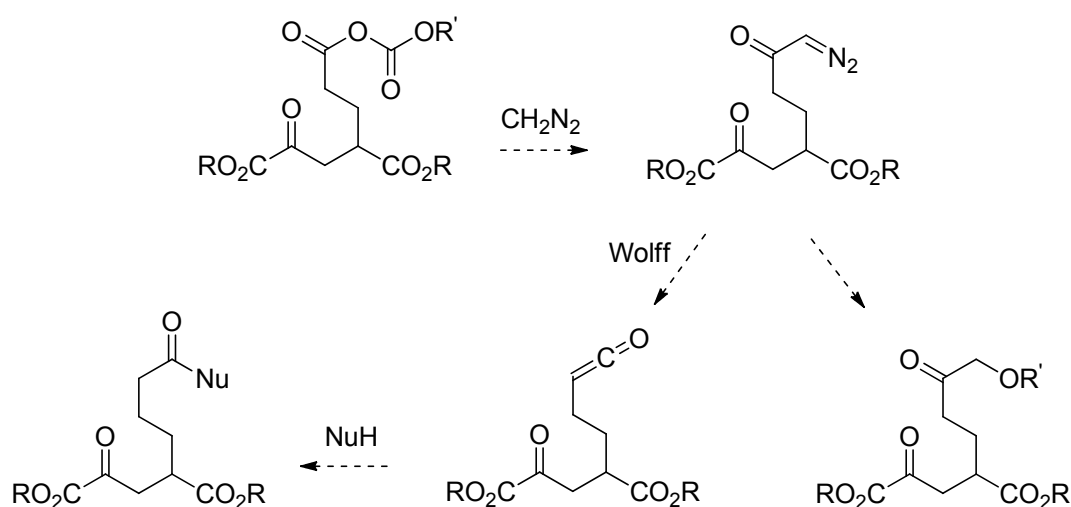


Schéma 145: stratégie de synthèse de divers céto-glutarates à partir d'une diazocétone.

Un seul essai a été effectué, en traitant l'anhydride **14** avec un excès de diazométhane préparé à partir de Diazald dans l'éther.²⁵³ Après une agitation à température ambiante pendant 3 heures et une purification par chromatographie, nous n'avons pas isolé la diazétone souhaitée mais le dérivé **71** avec un rendement de 31 %. La formation de ce produit est due à une addition du diazométhane sur la cétone conduisant à l'oxirane.

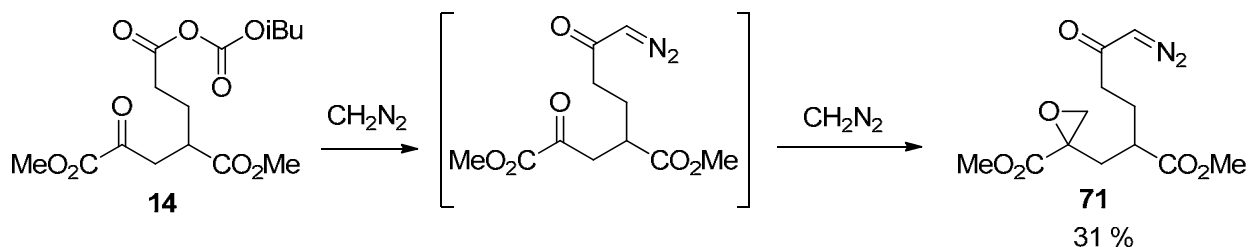


Schéma 146: réaction de l'anhydride **14** avec CH_2N_2 .

²⁵¹ I. S. Blagbrough, N. E. Mackenzie, C. Ortiz, A. I. Scott *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 1251-1254.

²⁵² P. Pinho, A. J. Minnaard, B. L. Feringa *Org. Lett.* **2003**, 5, 259-261.

²⁵³ T.H. Black, *Aldrichimica Acta* **1983** 16, 3-9.

Une quantité stœchiométrique de diazométhane permet peut-être d'obtenir une réaction chimiosélective et d'éviter la réaction d'époxydation. Cependant, par manque de temps, nous n'avons pas réalisé cet essai ni poursuivi cette approche.

1.11 Synthèse du dérivé nitrile **73**

La déshydratation de la fonction amide du cétooglutarate **17** en nitrile a été réalisée en présence d'anhydride trifluoroacétique (TFAA) et de pyridine dans le THF, selon une méthode décrite dans la littérature.²⁵⁴ Après une agitation à température ambiante pendant 2 heures, une purification par chromatographie sur gel de silice a permis d'isoler le nitrile **72** avec un rendement de 87 %. Les esters méthyliques du composé **72** ont été hydrolysés de façon chimiosélective selon le protocole standard. Le dicarboxylate **73** a été isolé avec un rendement quantitatif.

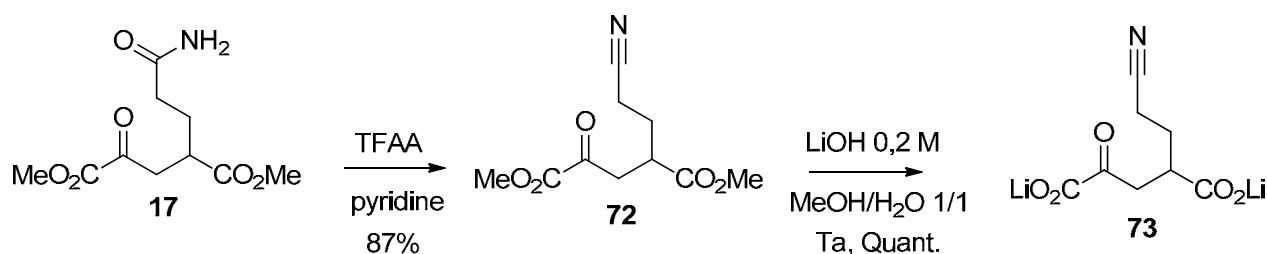


Schéma 147: préparation du cétooglutarate **73**.

Le composé **73** peut donner accès à divers dérivés après transamination. En effet, la fonction nitrile peut être transformée en amine par hydrogénation. Ce dérivé constitue donc, comme le composé **69** un précurseur potentiel pour de nombreux analogues du Glu. La fonction nitrile offre également un accès au cycle tétrazole, bioisostère de la fonction acide carboxylique (schéma 148).

²⁵⁴ V. V. Sureshbabu, S. A. Naik, G. Chennakrishnareddy *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 7038-7041.

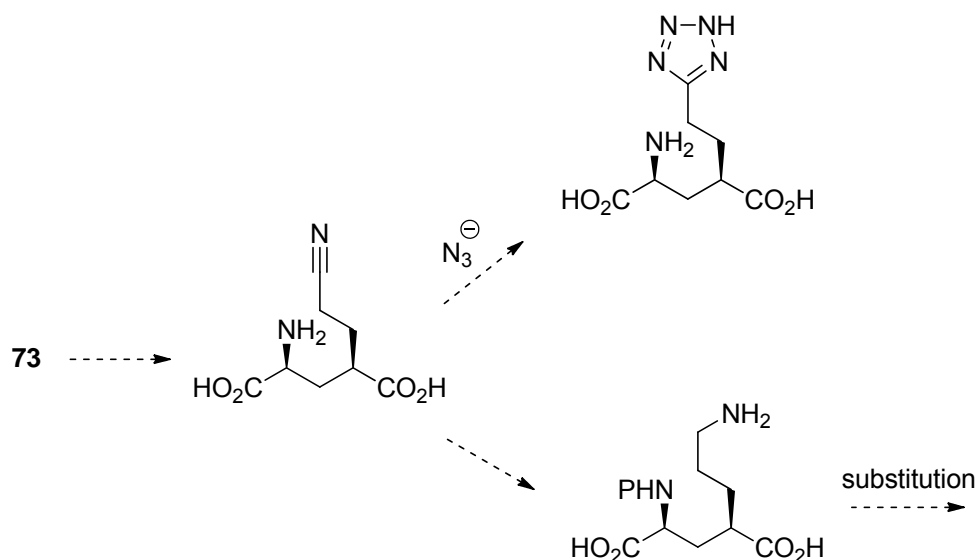
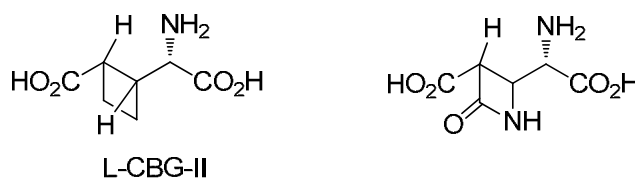


Schéma 148: intérêt du cétoacide 73.

1.12 Préparation d'un analogue hétérocyclique du KG comportant le cycle β -lactame

Le dérivé cyclobutanique L-CBG II préparé au laboratoire au cours d'un travail précédent est un agoniste sélectif des récepteurs métabotropiques du groupe II. Un des nos objectifs est la synthèse d'un analogue du L-CBG II comportant un cycle β -lactame.

Schéma 149 : structure du LCB-II et du dérivé β -lactame envisagé.

1.12.1 Travail antérieur

Au cours de sa thèse E. Sagot a tenté de mettre au point la synthèse de ce dérivé β -lactame, en utilisant la méthode de Wasserman à partir d'un acide carboxylique lui même obtenu en 3 étapes selon une approche originale mettant en jeu le réarrangement électrocyclique d'une pyridone et l'ozonolyse du cyclobutène obtenu (**schéma 150**).

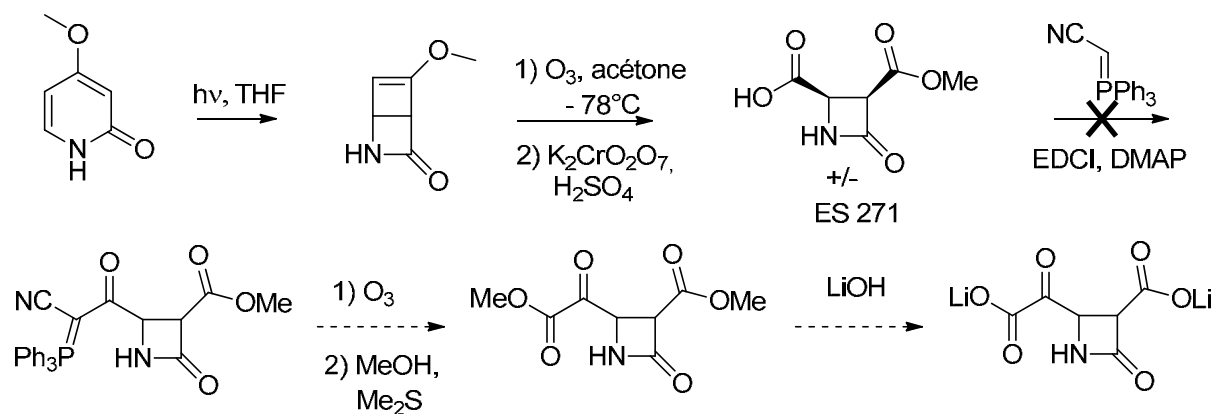


Schéma 150 : tentative de synthèse du dérivé β -lactame par l'utilisation de la méthode de Wasserman.

L'acide ES 271 a ainsi pu être obtenu sans difficulté majeure. Plusieurs essais de couplage ont ensuite été réalisés entre le composé ES 271 et le cyanophosphorane. Aucun d'entre eux n'a jamais donné accès au composé attendu, même après protection de la fonction amide.

1.12.2 Nouvelle stratégie

Afin de contourner les difficultés rencontrées avec la méthode de Wasserman, nous avons envisagé l'approche décrite dans le schéma suivant pour la synthèse du dérivé β -lactame.

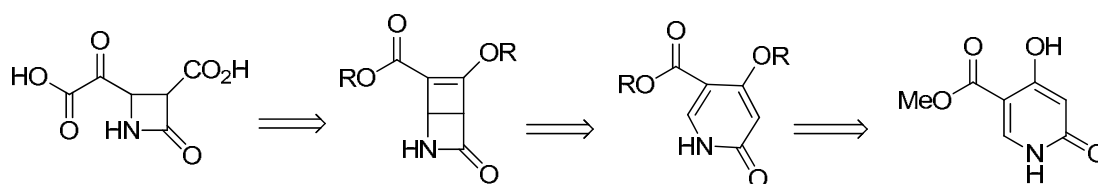


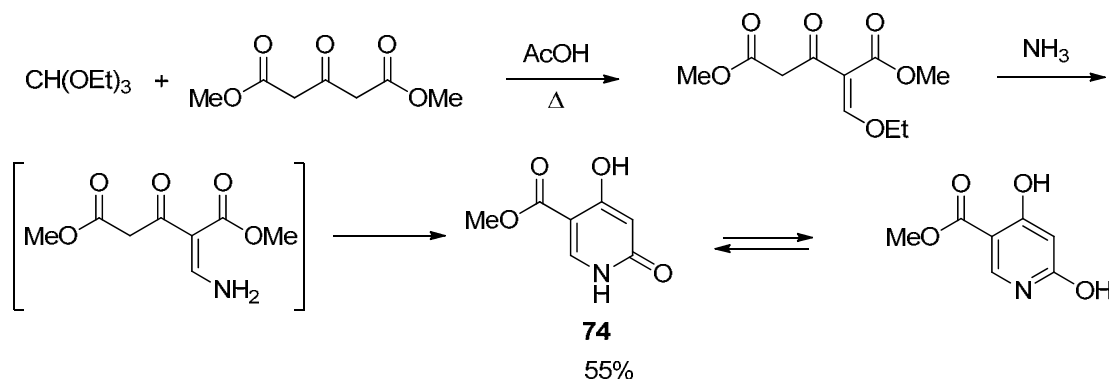
Schéma 151 : nouvelle stratégie envisagée pour la préparation de l'analogue β -lactame du KG.

La 4-hydroxypyridone carboxylée en position 5 dont la synthèse est décrite dans la littérature pourrait ainsi constituer un précurseur de choix pour accéder au cétoacide β -lactame.

1.12.3 Préparation du composé 74

La synthèse du composé **74** est décrite dans la littérature.²⁵⁵ Elle est basée sur une condensation de l'orthoformate d'éthyle et du 3-oxoglutarate de diméthyle en présence d'acide acétique. L'intermédiaire non isolé est ensuite traité par une solution d'ammoniaque pour donner le composé **74** isolé avec un rendement de 55 % (**schéma 152**).

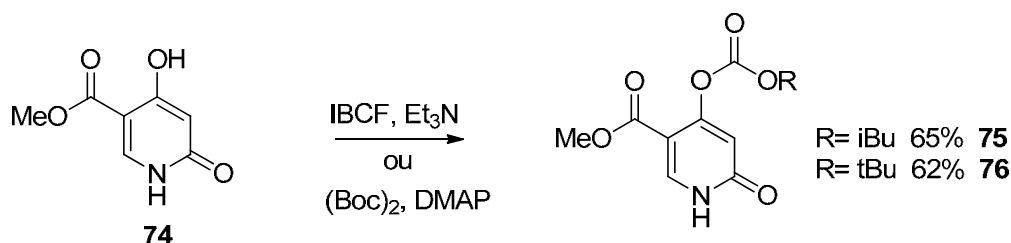
²⁵⁵ R. E. Leard, J. H. Bedenbaugh, A. O. Bedenbaugh *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, 20, 1363-1366.

Schéma 152 : synthèse du composé **74**.

1.12.4 Préparation des carbonates d'énol **75** et **76**

Comme cela apparaît dans le schéma 152, la 4-hydroxypyridone est en équilibre avec la forme 2,4-dihydroxypyridine et il peut s'avérer délicat de substituer l'oxygène en position 4 de façon régiosélective. Des exemples d'acylation sélective ayant été décrits, nous avons choisi d'introduire un groupement alkoxy-carbonyl en position 4 afin de former un carbonate d'énol. Ce dernier devrait donner accès après ozonolyse à un anhydride mixte carbonique, précurseur de la fonction ester.

Les carbonates d'énol **75** et **76** ont été préparés selon les méthodes utilisées précédemment pour la préparation des composés **11** et **12**.

Schéma 153 : synthèse des carbonates d'énol **75** et **76**.

A ce stade, nous avons bien obtenu les produits monosubstitués. Les analyses des composés par RMN (HMBC et HSQC) n'ont cependant pas permis de confirmer l'acylation sélective en position 4. La régiosélectivité n'a pu être démontrée qu'après l'étape photochimique suivante.

1.12.5 Réarrangement photochimique des composés **75** et **76**

Le réarrangement électrocyclique a été réalisé par irradiation d'une solution du carbonate d'énol (**75** ou **76**) dans CH_2Cl_2 . Après concentration du milieu réactionnel, les produits bicycliques **77** et **78** ont pu être caractérisés par RMN. En raison de leur stabilité

limitée, les produits obtenus n'ont pas été purifiés, mais engagés directement après concentration du milieu dans l'étape d'ozonolyse.

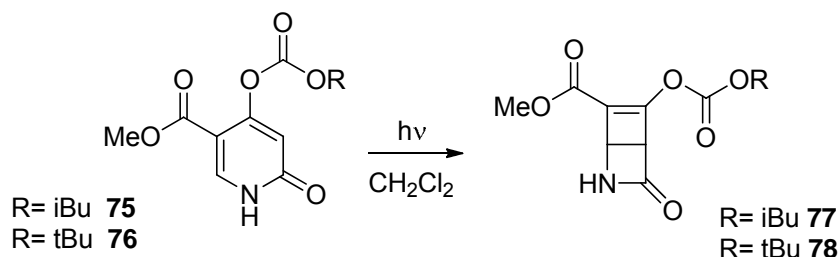


Schéma 154 : réarrangement photochimique des pyridones **75** et **76**.

Il est à noter qu'un essai de réarrangement électrocyclique à partir du composé **75** a été réalisé dans le THF, mais une dégradation du produit a été observée après concentration du milieu réactionnel.

1.12.6 Ozonolyse des composés **77** et **78**

Au cours du premier essai, nous avons étudié la synthèse de l'anhydride isobutylique **79** à partir du carbonate **77**. La réaction du méthanol (ajouté en excès pour éviter la réaction avec l'isobutanol libéré) avec **79** en présence de DMAP devrait conduire au cétoester attendu (**schéma 155**).

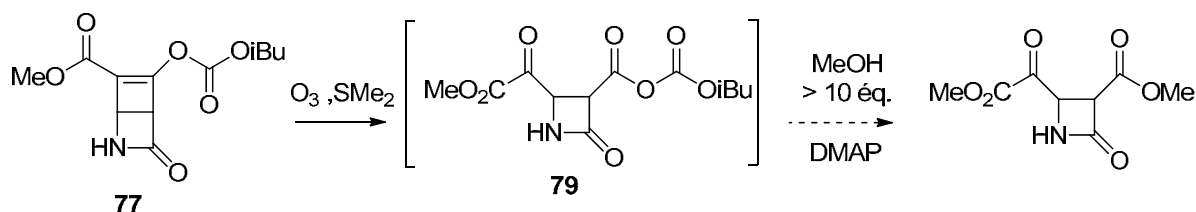


Schéma 155 : premier essai pour la préparation du cétoester β-lactame.

Cependant, après ozonolyse du composé **77** et ajout d'un large excès de méthanol et d'une quantité catalytique de DMAP, en même temps que le réducteur SMe_2 , nous n'avons pas obtenu le composé attendu mais un mélange de plusieurs composés parmi lesquels la lactone **80** a été isolée par chromatographie avec un rendement de 15 % (**schéma 156**).

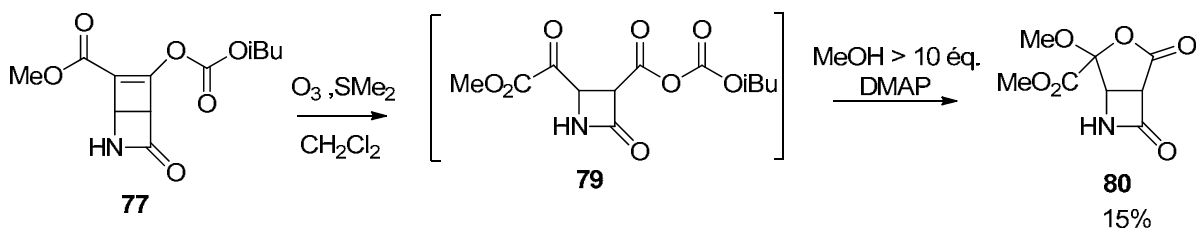


Schéma 156 : ozonolyse du carbonate **77** et réaction avec un large excès de méthanol.

Il semble donc que la fonction cétone subisse l'attaque de MeOH et interagisse avec la fonction anhydride (les 2 fonctions étant en configuration *cis*) pour produire une cyclisation.

Pour éviter l'excès de MeOH et les problèmes éventuellement liés, nous avons envisagé de réaliser la même réaction à partir du carbonate *tert*-butylique **78** et d'une quantité stœchiométrique de MeOH (**schéma 157**).

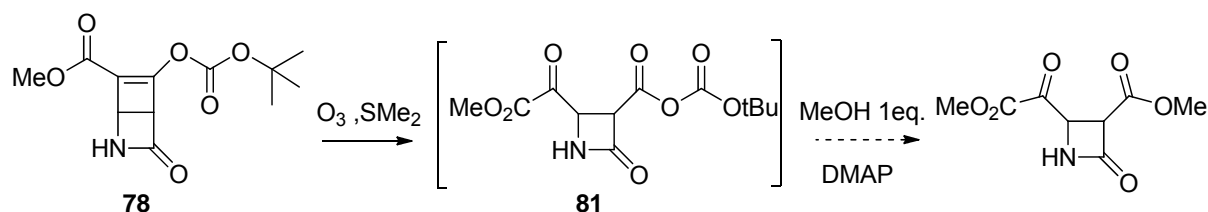


Schéma 157 : ozonolyse du carbonate **78** et réaction avec 1 eq. de MeOH.

Mais, comme dans le premier essai nous n'avons pas observé la formation du composé attendu et c'est la lactone **80** qui a encore été isolée avec un rendement de 28 %.

Il apparaît donc que la formation de la lactone **80** est très favorable et que l'attaque du MeOH s'effectue sur la fonction cétone même en présence d'une quantité stœchiométrique de MeOH.

1.12.7 Tentative d'hydrolyse de la lactone **80**

Nous avons tout de même, envisagé l'hydrolyse des fonctions esters de la lactone **80** en présence de LiOH. L'utilisation du protocole standard a permis d'observer la disparition du produit **80** mais celle-ci s'est accompagnée de la formation d'un mélange complexe, difficile à analyser.

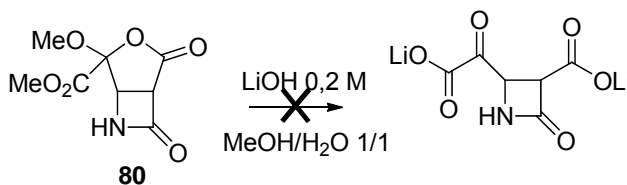


Schéma 158 : tentative d'hydrolyse de la lactone **80**.

Compte tenu des difficultés rencontrées pour former le dérivé β-lactame avec cette nouvelle approche via l'anhydride mixte, il apparaît intéressant de générer l'ester méthylique directement par ozonolyse. Ceci serait possible en effectuant la méthylation régiosélective de

la pyridone **74** (**schéma 159**). Par manque de temps, nous n'avons pas pu étudier ce nouvel enchaînement réactionnel.

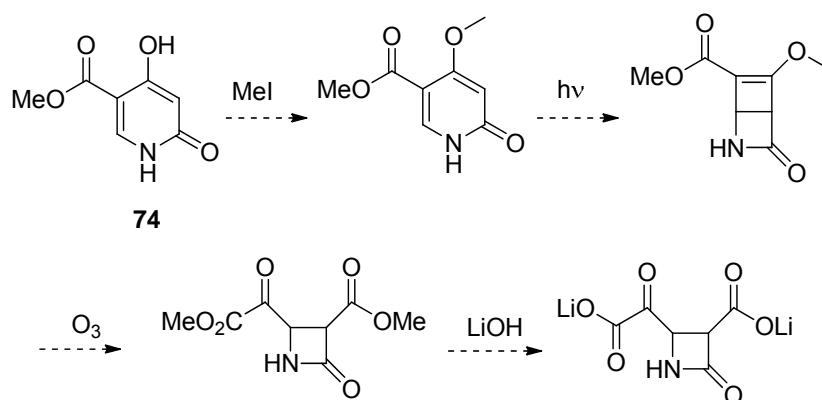


Schéma 159 : perspective pour former le dérivé β -lactame.

Chapitre II Synthèse d'analogues du Glu par transamination en utilisant l'AspAT d'*E.coli*

2.1 Etude de la réaction de transamination

Les analogues du KG que nous avons synthétisés ont été évalués en tant que substrats de l'AspAT d'*E.coli*. Dans le cas où une activité appréciable a pu être mise en évidence, nous avons réalisé la réaction de transamination à l'échelle préparative, nous permettant alors d'obtenir des analogues du Glu de la série L.

2.1.1 Production de l'AspAT

Nous disposons au laboratoire d'une souche d'*E.coli* surexprimant le gène sauvage de l'AspAT élaborée dans l'équipe du Pr. Kagamiyama (université d'Osaka). Cette souche dénommée AspC correspond à une souche d'*E.coli* (TY103) déficiente pour le gène constitutif AspC codant pour l'AspAT et transformée avec le plasmide pUC19-AspC. Ce plasmide contient le gène AspC en aval d'un promoteur fort et possède également un gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les cellules transformées efficacement. L'amplification de la production de l'AspAT correspond à un facteur d'environ 500 par rapport à la souche sauvage (Kamitori, 1987).²⁵⁶ La production de l'AspAT d'*E.coli* au laboratoire débute par une culture d'une nuit de la souche AspC en présence d'ampicilline. Un extrait brut est alors préparé par broyage des cellules et élimination des débris cellulaires par centrifugation. Deux étapes chromatographiques d'échange d'ion (supports DEAE-Toyopearl® et hydroxyapatite) permettent ensuite d'isoler l'AspAT avec une très bonne pureté. La solution d'enzyme est finalement dialysée avec une solution saturée de sulfate d'ammonium et l'enzyme est stockée sous sa forme précipitée. Elle peut être ainsi conservée à 4°C, sans perte d'activité pendant plusieurs années. Le tableau ci-dessous présente, à titre d'exemple, les résultats obtenus au cours d'une purification à partir de 10 g de cellules (environ 2 L de culture).

²⁵⁶ S. Kamitori, K. Hirotsu, T. Higuchi, K. Kondo, K. Inoue, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, Y. Higuchi, N. Yasuoka, M. Kusunoki, Y. Matsuura, *J. Biochem.* **1987**, *101*, 813-816.

Etapes	Volume mL	Activité* UI/mL	[protéines] mg/mL	Act. Totale UI	Act. Spec. UI/mg
1 Extrait brut	170	34	11,5	5710	3
2 DEAE-Toyopearl	35	135	1	4750	136
3 Hydroxyapatite	45	107	0,22	4810	468
4 Dialyse (NH₄)₂SO₄	11	436	1	4799	468

*1UI est définie comme étant la quantité d'enzyme permettant de convertir 1 μ mole de KG (4mM) en Glu en 1 min. en présence d' Asp (40 mM) et dans un tampon KPi 100 mM, pH 7,6 et à 25°C.

Tableau 14 : Purification de l'AspAT d'*E. coli*

2.1.2 Etude de l'activité de l'AspAT vis-à-vis des analogues du KG

2.1.2.1 Protocole de mesure de l'activité enzymatique

L'activité de l'AspAT pour les différents substrats a été étudiée sur la base du modèle de Michaelis-Menten en mesurant la vitesse initiale des réactions enzymatiques.

Modèle de Michaëlis-Menten

Dans ce modèle, l'enzyme E en présence du substrat S forme un complexe dissociable ES qui libère ensuite le produit de la réaction P (**schéma 160**). Le mécanisme de la réaction transamination est du type ping-pong (voir bibliographie page 68), et ce modèle constitue une approximation utilisable si l'on utilise une concentration fixe et saturante de l'un des 2 substrats (l'acide aminé donneur dans notre cas).

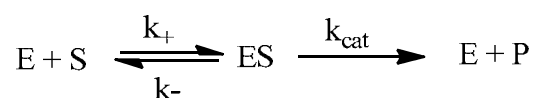


Schéma 160 : modèle cinétique de Michaelis-Menten.

L'enzyme constitue le catalyseur de cette réaction et elle est en concentration très inférieure à celle du substrat. Ainsi on atteint vite un état quasi-stationnaire où la concentration en complexe ES (noté : [ES]) demeure constante tant que la concentration en substrat varie peu. Dans ce cas, la vitesse initiale d'apparition du produit P notée V demeure constante un certains temps (équation).

$$V = k_{cat} \cdot [ES] = V_m \cdot [S] / ([S] + K_m)$$

Ce modèle permet donc de définir expérimentalement les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique qui sont la constante de Michaelis notée K_m et la vitesse maximale nommée V_m , définis ci-dessous :

$$K_m = [E] \cdot [S] / [ES] = (k_- + k_{cat}) / k_+$$

$$V_m = k_{cat} \cdot [E_t]$$

Avec $[E_t] = [E] + [ES]$: concentration totale en enzyme

En traçant V en fonction de $[S]$, on obtient le graphique ci-dessous. Si $V = V_m/2$, alors $[S] = K_m$. Lorsque $[S]$ est très supérieur à la valeur de K_m , on atteint un état de saturation pour lequel $V = V_m$.

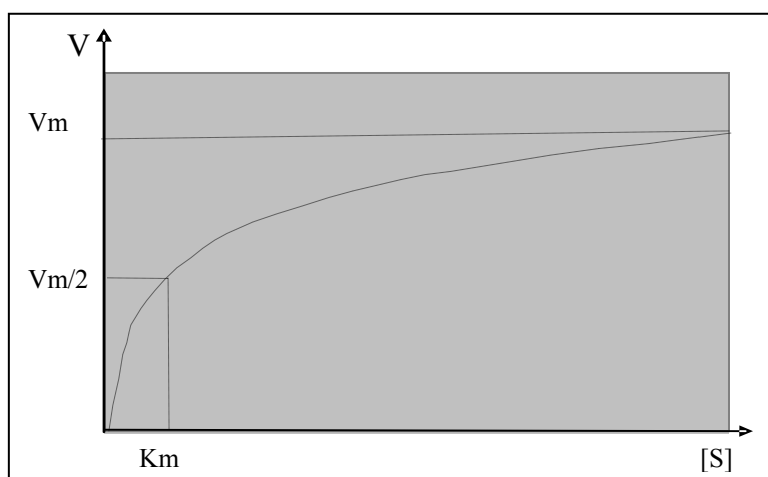


Figure 56 : graphique représentant V en fonction de $[S]$.

En traçant $([S]/V)$ en fonction de $[S]$ (représentation graphique de Hanes-Woolf), on peut déterminer graphiquement les valeurs de K_m et de V_m en déterminant la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite.

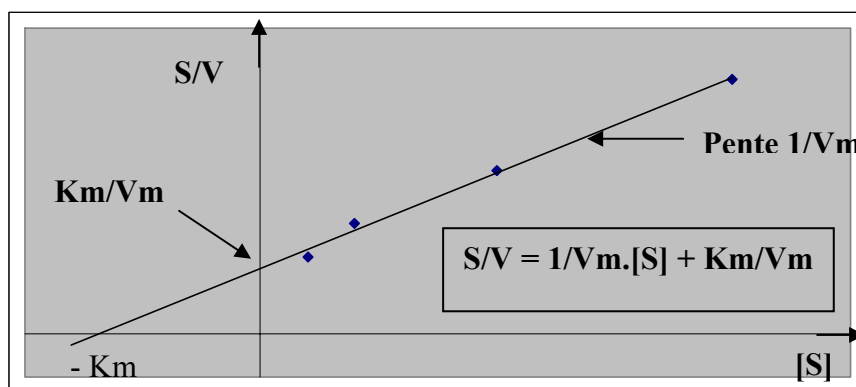


Figure 57 : graphique de Hanes-Woolf.

C'est donc en mesurant expérimentalement la vitesse initiale de la réaction pour différentes concentrations en cétoacide et en présence d'une concentration fixe et quasi-saturante en Asp, que nous déterminons les paramètres cinétiques K_m et k_{cat} relatifs au cétoacide. La constante K_m , d'après l'équation 4, est proche de la constante de dissociation $K_s (= k^- / k^+)$ dans le cas où k_{cat} est très inférieure aux constantes k_+ et k_- . Le K_m rend ainsi compte de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat. Plus sa valeur est faible, meilleure est l'affinité. Le rapport k_{cat}/K_m permet de rendre compte de l'efficacité globale de l'enzyme. Cependant, dans notre cas, notre objectif synthétique nous amène à accorder une importance particulière à la valeur de k_{cat} . En effet, sous réserve que la valeur de K_m mesurée pour le cétoacide, ne soit pas trop élevée, il est à priori possible et préférable d'utiliser une concentration en substrat largement supérieure au K_m (20 mM en général) et d'approcher ainsi la saturation de l'enzyme ($[ES] = [Et]$) et la vitesse maximale $V_m = k_{cat} [Et]$.

Procédure de détermination des paramètres K_m et k_{cat}

Les mesures de vitesse initiale V sont effectuées par spectrophotométrie en mettant en jeu une réaction enzymatique auxiliaire catalysée par la Malate Déshydrogénase (MDH, EC.1.1.1.37) et consommant le cofacteur NADH (**schéma 161**). Ainsi, la MDH catalyse la réduction par le NADH de l'OA formé à partir de l'Asp. Il suffit alors de suivre la disparition linéaire du cofacteur NADH à 340 nm (coefficient d'extinction molaire ϵ de $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

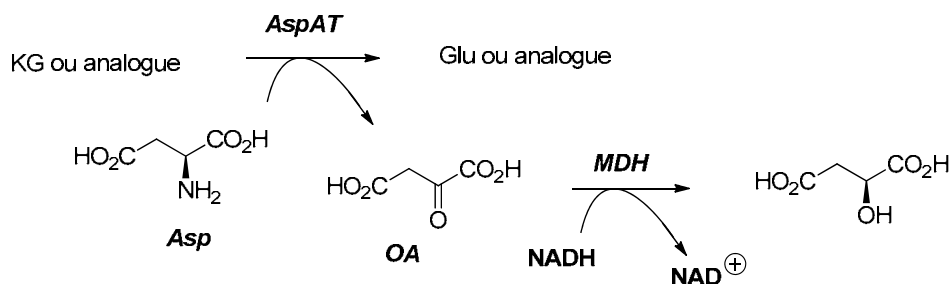


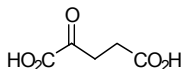
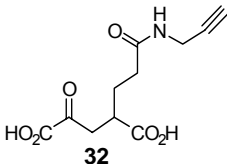
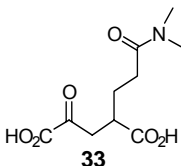
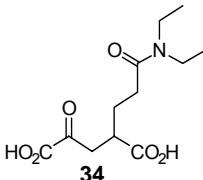
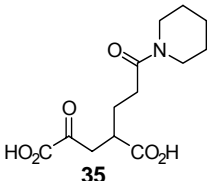
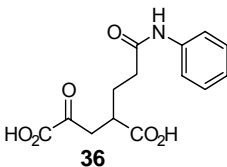
Schéma 161 : protocole de mesure de l'activité de l'AspAT vis-à-vis du KG ou de ses analogues.

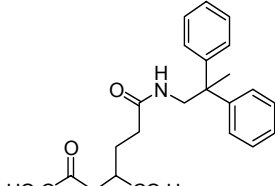
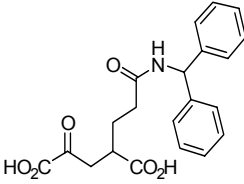
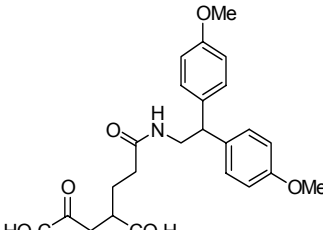
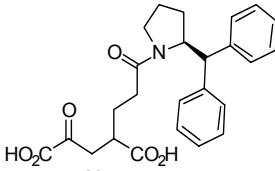
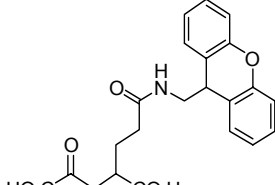
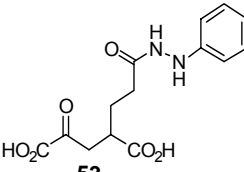
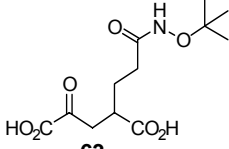
La quantité de MDH utilisée permet d'avoir une activité bien supérieure à celle de l'AspAT et de rendre la 2^{ème} étape de réduction de l'OA non limitante. Par ailleurs nous travaillons à une concentration fixe et quasi-saturante en Asp de 40 mM ($K_m = 4\text{mM}$). Les paramètres que nous avons ainsi déterminés sont donc des constantes apparentes relatives à ces conditions expérimentales. Notons que lors de l'étude cinétique de chaque analogue du KG, nous avons répété la détermination des valeurs des paramètres cinétiques relatifs au substrat naturel KG. Les constantes de vitesse k_{cat} et les rapports k_{cat}/K_m seront ainsi exprimés en pourcentage relatif par rapport au substrat naturel. Cette précaution permet de corriger les

variations expérimentales liées à l'emploi de lots et de quantité d'enzymes différents lors de l'étude des divers analogues. De plus, chaque étude est accompagnée de calculs d'incertitudes (écarts type par la méthode des moindres carrés et utilisation de la Loi de Gauss pour la propagation des erreurs) lors de la détermination graphique des paramètres cinétiques afin d'évaluer la précision de nos mesures.

2.1.2.2 Résultats

Les différents analogues du KG dont nous avons décrit la synthèse précédemment, ont été évalués en tant que substrats de l'AspAT d'*E.coli*. Le tableau suivant regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu.

Substrat	K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)
	$0,23 \pm 0,04$	100 ± 3	100 ± 18
	$2,7 \pm 0,2$	$34,8 \pm 2,8$	$2,9 \pm 0,7$
	$4,2 \pm 1$	$13,9 \pm 3,2$	$0,75 \pm 0,30$
	$0,7 \pm 0,06$	$21,2 \pm 1,4$	$7 \pm 1,7$
	$0,8 \pm 0,1$	$7,6 \pm 1$	$2,2 \pm 0,7$
	$2,7 \pm 0,2$	$3,9 \pm 1,5$	$0,33 \pm 0,25$

 <p>37</p>	$2,2 \pm 0,03$	$13,8 \pm 1,5$	$1,4 \pm 0,9$
 <p>38</p>	$1,5 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$
 <p>39</p>	$1,3 \pm 0,09$	$34,2 \pm 1,9$	$5,7 \pm 1,3$
 <p>40</p>	$0,34 \pm 0,24$	$1,5 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,7$
 <p>41</p>	$1,4 \pm 0,3$	$6,2 \pm 1,1$	$1,0 \pm 0,3$
 <p>53</p>	$3,15 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,1$
 <p>63</p>	$2,1 \pm 0,03$	$1,9 \pm 0,2$	$0,20 \pm 0,06$

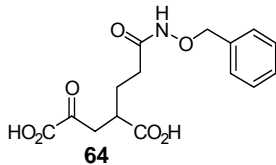
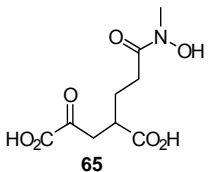
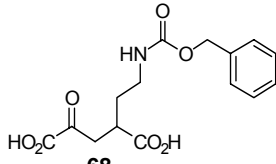
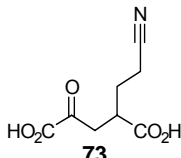
 64	$4,3 \pm 1,0$	$4,0 \pm 0,9$	$0,21 \pm 0,08$
 65	$4,7 \pm 1,0$	$5,4 \pm 1,2$	$0,26 \pm 0,10$
 68	$0,92 \pm 0,26$	112 ± 13	$27,8 \pm 10,0$
 73	$0,70 \pm 0,03$	$69,6 \pm 2,0$	$22,2 \pm 0,5$

Tableau 15 : paramètres cinétiques de la réaction de transamination des analogues du KG substitués en position 4 par l'AspAT.

Il convient tout d'abord de rappeler que les paramètres cinétiques ont été déterminés avec les mélanges racémiques et que compte tenu de la grande énantiosélectivité de l'AspAT qui n'est plus à démontrer, les valeurs de K_m obtenus devraient être divisées par 2 puisqu'un seul des énantiomères est substrat de l'enzyme. Il en va de même, pour les rapports de K_{cat}/K_m dont la valeur est en réalité deux fois plus importante que celle mentionnée dans le tableau ci-dessus.

Série des amides :

Les paramètres mesurés dans cette série sont proches de ceux évalués précédemment par E. Sagot (**tableau 8**, page 99). L'AspAT manifeste une activité modeste pour ces composés avec des valeurs de K_m compris entre 0,3 et 4 mM et de k_{cat} relatif entre 1,5 et 35 % par rapport au substrat naturel.

Parmi les meilleurs substrats de cette série on trouve l'amide propargylique **32** ou encore le dérivé encombré hydrophobe **39** qui illustre encore une fois l'aptitude exceptionnelle de l'AspAT pour accepter dans son site actif des groupements volumineux et hydrophobes.

Les amides tertiaires disubstitués sur l'atome d'azote (**33**, **34**, **35**, **40**) sont également bien tolérés avec ici encore une affinité significativement plus marquée pour les substituants volumineux.

Dérivés hydrazides et hydroxamates

Ces analogues sont transformés par l'AspAT avec une activité sensiblement plus faible que celle mesurée avec les amides ce qui montre de nouveau que l'introduction d'hétéroatomes supplémentaires sur le substituant n'est pas un facteur favorable à la liaison du substrat dans le site actif. Ces résultats sont cohérents avec le positionnement du substituant en position 4 dans le tunnel hydrophobe reliant le site actif au solvant.

Les résultats obtenus avec le carbamate 68 sont par contre tout à fait remarquables. En effet, ce dérivé est transformé quasiment aussi efficacement que le substrat naturel avec une affinité seulement 3 fois plus faible et une valeur de k_{cat} relatif proche de 100 %. La comparaison avec l'hydroxamate benzylé **63** montre que la simple inversion des groupements CO et NH permet de modifier l'activité avec un facteur supérieur à 100.

Enfin le nitrile 72 apparaît lui aussi comme un excellent substrat avec des paramètres cinétiques très voisins de ceux mesurés avec les dérivés alkylés (tableau 8, page 99).

En conclusion, dans tout les cas les paramètres cinétiques obtenus sont satisfaisant, puisqu'ils restent dans la gamme millimolaire pour le K_m et autour de 10 % pour le k_{cat} , ce qui nous a permis de réaliser la réaction de transamination sans difficulté.

2.2 Préparation des analogues du Glu

Comme cela a été démontré au cours des travaux précédents l'AspAT montre une enantiopréférence très marquée dans le cas d'analogues du KG substitués en position 4. Nous avons confirmé cette propriété avec les analogues du KG préparé au cours de ce travail de thèse. Le dédoublement cinétique des mélanges racémiques des divers cétoacides a donc été effectué en arrêtant la réaction à un taux de conversion d'environ 45 %. Dans ces conditions, nous avons obtenu les analogues du Glu de configuration L-2,4-*syn* avec d'excellents excès énantiomériques ($ee > 98\%$) et diastéréoisomériques ($de > 98\%$).

2.2.1 Procédé biocatalytique

Nous avons appliqué le procédé biocatalytique mis au point au laboratoire pour la synthèse d'analogues du Glu à l'échelle préparative. Ce procédé met en jeu l'ACS comme aminoacide donneur. Comme cela a déjà été évoqué, ce composé a l'avantage de former,

après transamination, un intermédiaire instable qui se décompose instantanément en pyruvate entraînant ainsi le déplacement d'équilibre de la réaction de transamination catalysée par l'AspAT d'*E.coli*.

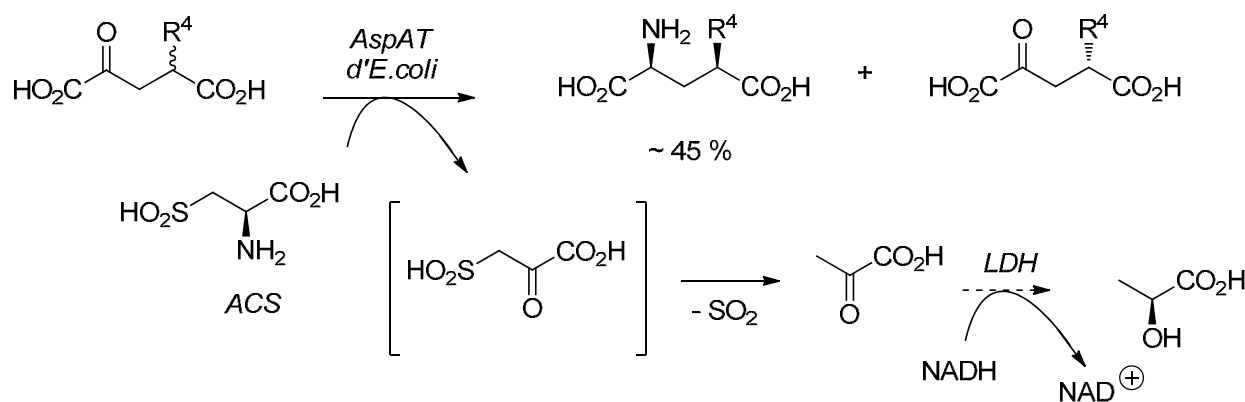


Schéma 162 : procédé de transamination pour le dédoublement cinétique des analogues du KG.

Le suivi de la réaction se fait par dosage enzymatique du pyruvate formé en utilisant la Lactate Déshydrogénase (LDH) (comme le schéma ci-dessus le décrit). Ainsi, la quantité de NADH consommée est égale à celle du pyruvate produit qui équivaut à la quantité d'analogue du KG consommé au temps d'analyse. Il est à noter que la réaction de transamination ne doit pas durer plus de quelques heures afin d'éviter l'inhibition de l'AspAT par le SO₂ mais aussi en raison de la faible stabilité du pyruvate en solution.

La concentration de l'analogue du KG présent en solution peut également être déterminée par dosage en utilisant le protocole décrit au schéma 163 et en présence d'un excès de NADH. La quantité consommée de NADH est égale à la quantité d'analogue du KG présent dans la solution. Compte tenu de l'énantiopréférence de l'AspAT, cette valeur doit être multipliée par 2, pour avoir la concentration de l'analogue du KG racémique.

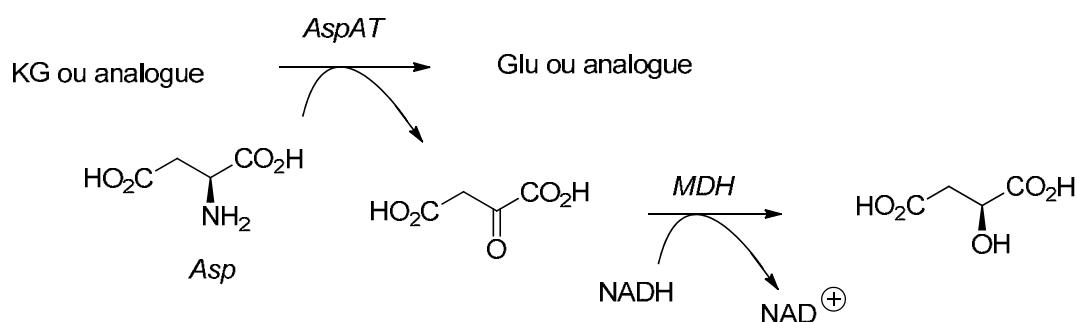


Schéma 163 : protocole de dosage de l'analogue du KG résiduel au cours de la transamination enzymatique.

Lorsque le taux de conversion atteint 45 %, le milieu réactionnel est déposé sur une colonne de résine fortement acide (du type Dowex 50) afin de séparer l'analogue du Glu des autres réactifs et produits de la réaction. Dans un premier temps la colonne est lavée à l'eau pour éliminer toutes les espèces neutres comme le cétoacide en excès (enantiomériquement enrichi), le pyruvate mais aussi l'ACS qui présente un point isoélectrique plus bas que les analogues du Glu (**schéma 164**). Une seconde élution avec une solution aqueuse d'ammoniaque 1M permet de décrocher l'analogue du Glu désiré.

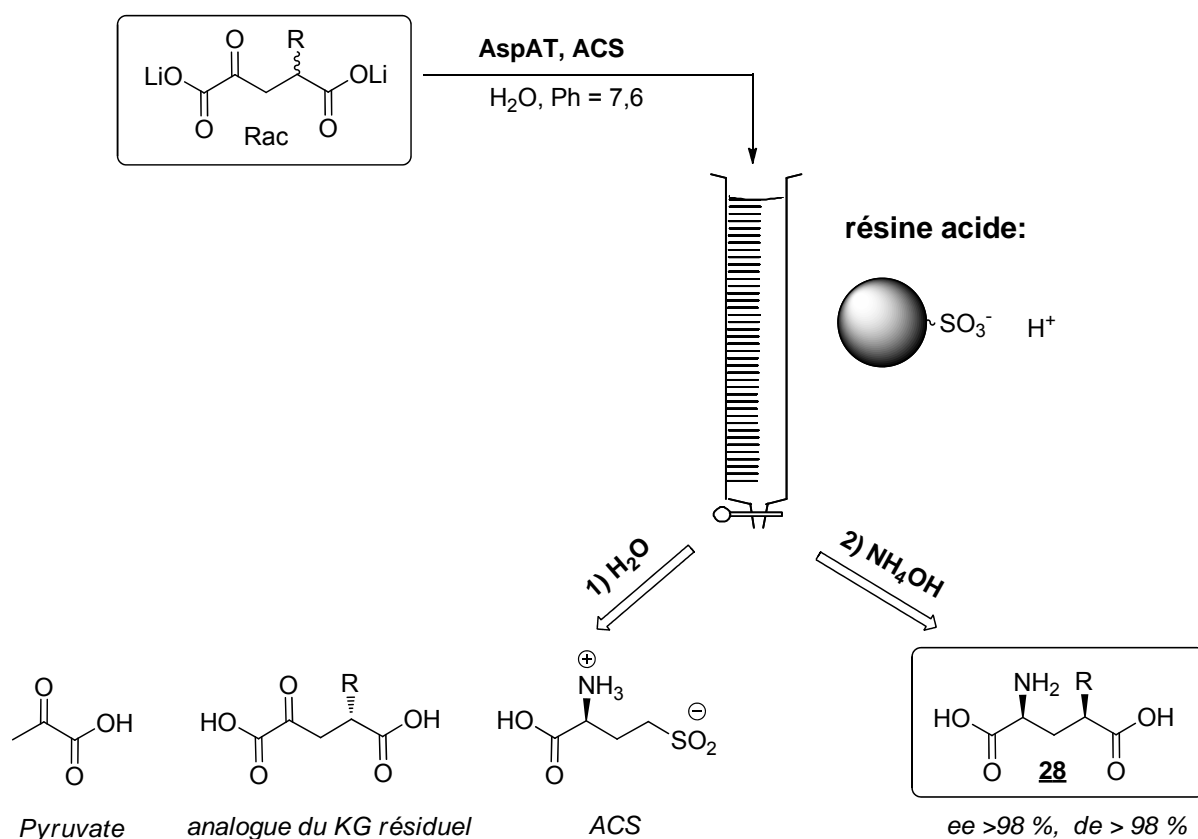


Schéma 164 : purification sur résine acide après transamination.

Une seconde purification sur colonne de résine basique type Dowex 1 ou 2 (équilibrée par des ions acétate) permet d'obtenir l'acide aminé souhaité avec une très grande pureté, indispensable pour l'évaluation des activités biologiques : l'acide sous forme anionique ($pH > 7$) est tout d'abord adsorbé sur la résine cationique avant d'être sélectivement élué en utilisant un gradient d'acide acétique. Après concentration les produits sont finalement isolés par lyophilisation sous la forme de solides blancs.

2.2.2 Synthèse et purification des amides 82-88

Les réactions de transamination de chacun des cétoacides substrats **30-36** et la purification des différents aminoacides ont été réalisées sans problème selon le protocole décrit standard. Les analogues du Glu **82-88** ont tous été obtenus avec des rendements de l'ordre de 40 % après purification et avec une excellente pureté confirmée par les différentes analyses.

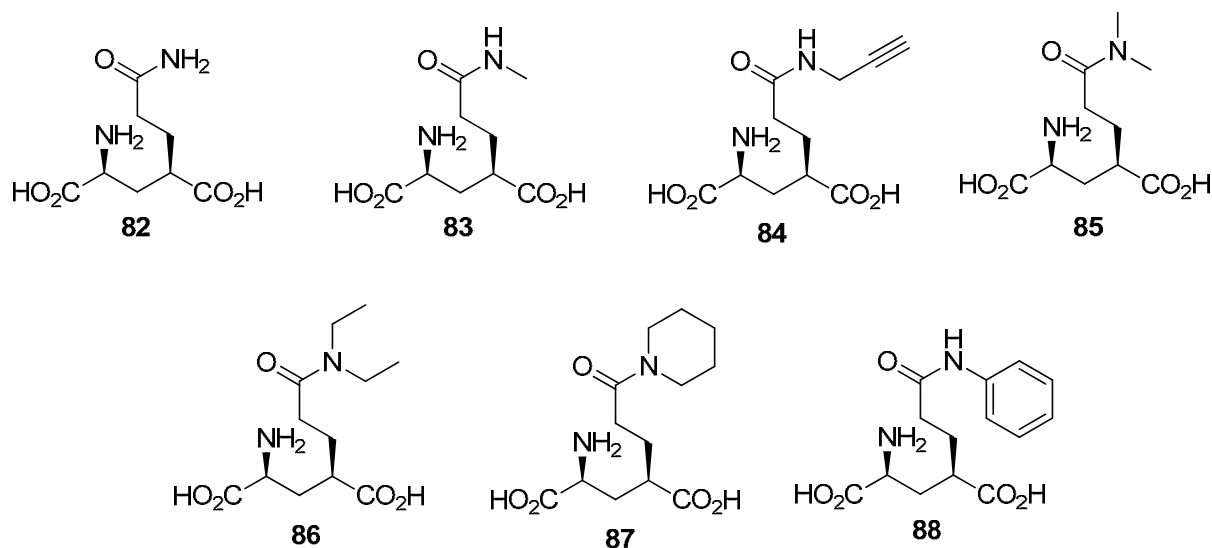


Figure 58 : nouveaux analogues du Glu fonctionnalisés en position 4 par une fonction amide

2.2.3 Synthèse et purification des amides 89-93

Les cétoacides possédant un groupement volumineux hydrophobes **37-41** ont été soumis au protocole général décrit précédemment. Cependant, nous avons rencontré des problèmes au cours de la purification sur résine basique des analogues du Glu **89-93**. En effet ces composés sont très peu solubles dans l'eau et présentent une forte adsorption sur la résine due aux interactions hydrophobes avec le support à base de polystyrène des résines Dowex. Nous avons utilisé du MeOH (jusqu'à 50 %) pour faciliter l'élution de ces composés. Cependant, nous avons observé la formation de pyroglutamate au cours de l'étape de concentration.

Plusieurs essais de purification en phase inverse (silice greffé ¹⁸C) en utilisant des gradients de MeOH avec ou sans acide formique, n'ont pas permis d'améliorer la pureté des analogues du Glu **89-93**.

Les meilleurs résultats ont été finalement obtenus par purification sur une résine échangeuse d'ion de type QAE Séphadex en éluant avec un gradient de bicarbonate d'ammonium. En effet, le support Sephadex est constitué de polysaccharides, ce qui limite les

interactions hydrophobes. La solution de bicarbonate à pH neutre permet par ailleurs d'améliorer la solubilité de nos composés en phase aqueuse. Après concentration et élimination du bicarbonate d'ammonium sous pression réduite, les produits ont été isolés par lyophilisation avec des puretés variables (83 à 98 % déterminé par HPLC par détection UV à 220 nm).

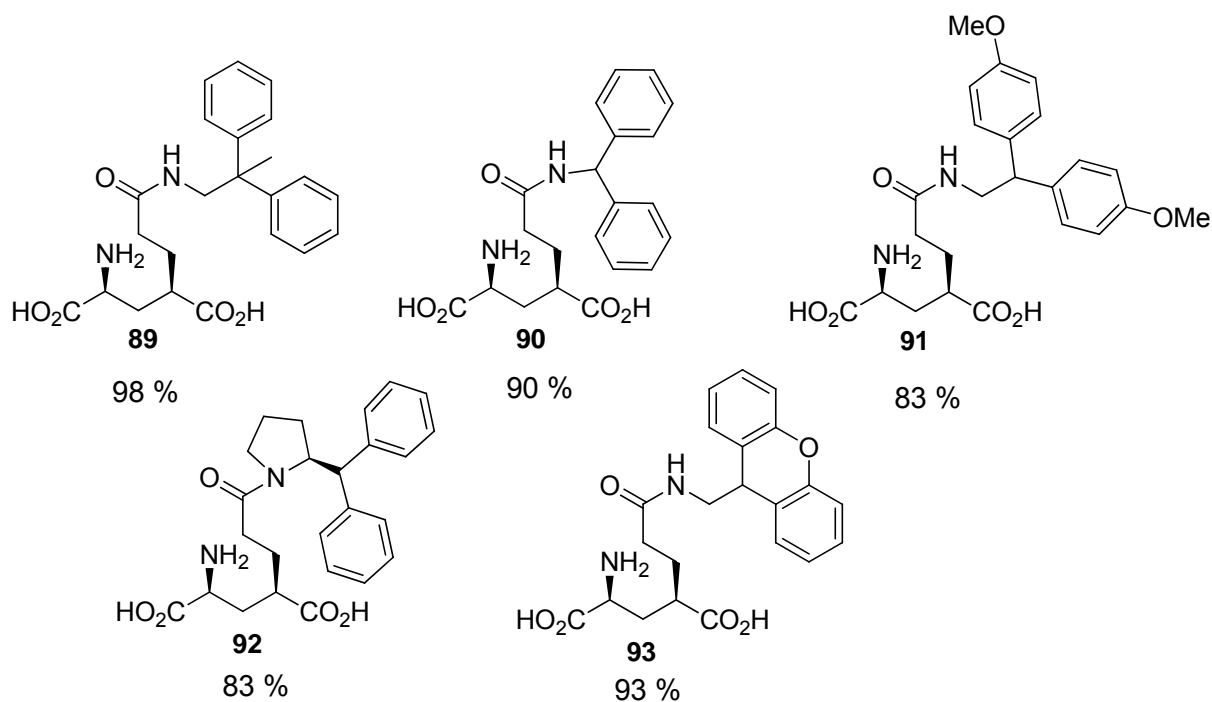


Figure 59 : puretés des analogues du Glu **89- 93** préparés.

Bien que la pureté des dérivés **89-93** ne soit pas totalement satisfaisante, nous avons décidé d'effectuer les premiers tests pharmacologiques sur ces échantillons avant de poursuivre nos efforts pour améliorer la pureté de ces dérivés.

2.2.4 Synthèse et purification de l'ester 94

La réaction de transamination du cétoacide substrat **51** a été réalisée sans problème selon le protocole général. A l'issue de la réaction de transamination, l'analogue du Glu **94** a été purifié directement sur la résine basique afin d'éviter l'hydrolyse de l'ester en milieu basique lors de l'élution avec l'ammoniaque.

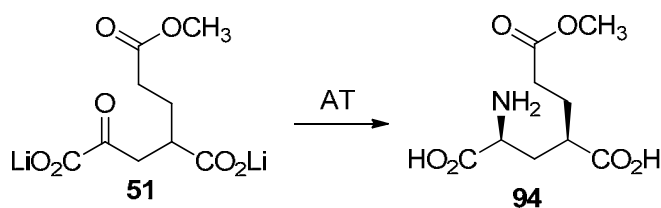


Schéma 165 : synthèse de l'ester 95

2.2.5 Synthèse et purification de l'hydrazide 95

La conversion du cétoacide **53** en analogue du Glu **95** a été réalisée selon le protocole général. Comme dans le cas de l'ester **51**, l'analogue du Glu **95** a été purifié directement sur la résine basique. En effet, nous avons observé l'hydrolyse de l'hydrazide lors du dépôt sur la résine acide suivi de l'élution avec l'ammoniaque. Dans le cas de ce composé, cette étape unique de purification sur Dowex 1 a permis de séparer l'analogue du Glu des différents constituants du milieu réactionnel. L'analyse par RMN de l'analogue du Glu **95** dans D₂O et dans le DMSO a montré la présence des deux rotamères dont les proportions varient avec le solvant (respectivement 93/7 et 86/14) (**schéma 166**).

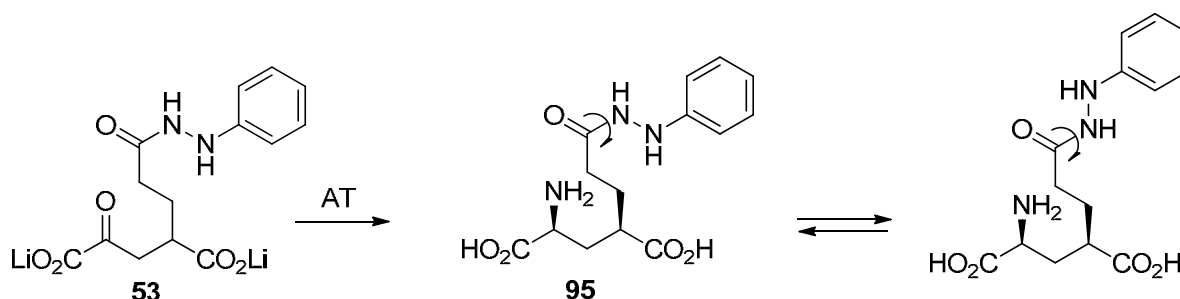


Schéma 166 : synthèse de l'hydrazide **95**.

2.2.6 Synthèse et purification des hydroxamates 96-97

Dans le cas des cétoacides **63**, **64** et **65**, à l'issue de la réaction de transamination, le milieu réactionnel a également été déposé directement sur la résine basique, afin d'éviter l'hydrolyse des composés sur la résine acide lors de l'élution à l'ammoniaque. Les analogues **96** et **97** protégés ont été ainsi purifiés et isolés sans difficulté après une élution de la résine basique avec un gradient d'AcOH.

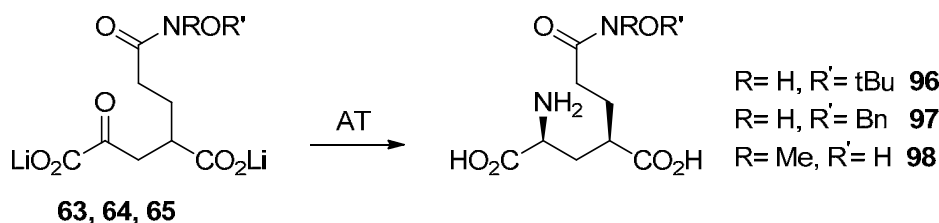


Schéma 167 : synthèse des hydroxamates **96**, **97** et **98**.

Cependant, dans le cas de l'hydroxamate méthylé **98**, une réaction de cyclisation a été observée après concentration des fractions, conduisant à la formation du lactame **99** à 7 chaînons constituant jusqu'à 6 % du produit final (**schéma 168**). Cette cyclisation est vraisemblablement catalysée par l'acide acétique présent dans les fractions d'élution

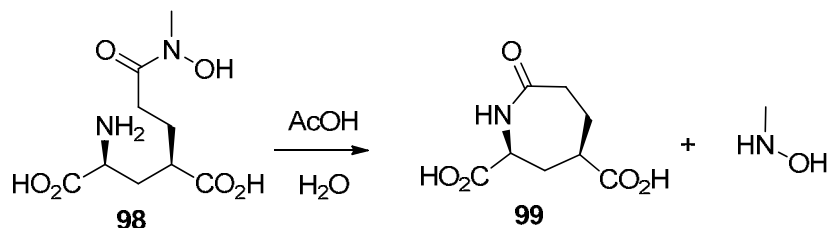


Schéma 168 : formation du lactame **99**.

Après plusieurs essais de purification, les meilleurs résultats ont été obtenus selon le protocole suivant: le milieu réactionnel a été déposé sur une résine acide (Dowex 50) qui a été éluée avec une solution d'acétate d'ammonium. Après concentration des fractions contenant le produit, le résidu a été déposé sur la résine basique (Dowex 1) équilibrée avec des ions bicarbonates. Une élution avec un gradient de bicarbonate d'ammonium a finalement permis d'obtenir l'analogue du Glu **98** avec une pureté supérieure à 98 % (déterminée par HPLC à 225 et 210 nm).

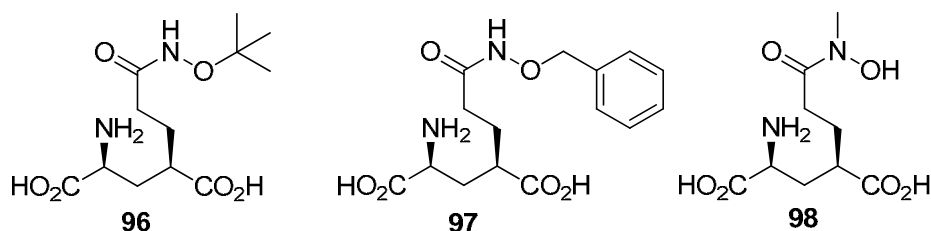


Figure 60 : nouveaux analogues du Glu fonctionnalisés en position 4 par des hydroxamtes.

2.2.7 Synthèse de l'hydroxamate **100**

Comme nous l'avons déjà expliqué nous avons envisagé l'obtention de l'hydroxamate **100** après déprotection des hydroxamates **96** et/ou **97**.

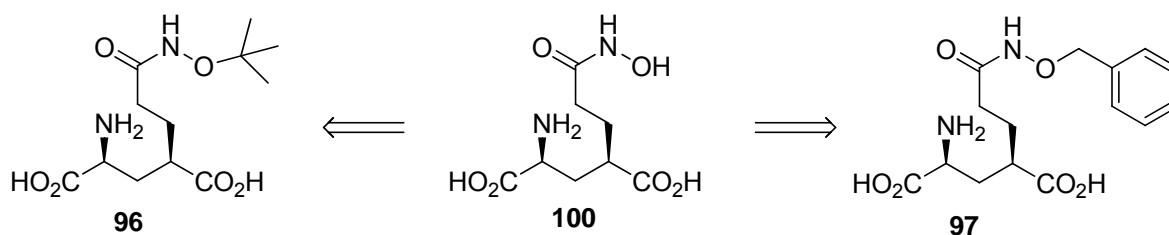


Schéma 169 : voies envisagées pour obtenir l'hydroxamate **100**.

2.2.7.1 Déprotection de l'hydroxamate 96

Nous avons réalisé deux essais d'élimination du groupement *tert*-butyle en présence de TFA. Le premier a été réalisé en présence de TFA concentré. Le milieu a été agité à température ambiante pendant une nuit. Après purification sur résine basique, nous avons isolé le pyroglutamate **101** (50 % de rendement, identifié par RMN et SM) et une fraction contenant un mélange de l'hydroxamate **100** et du produit de départ non déprotégé **96**.

L'utilisation d'une solution aqueuse diluée de TFA (1 M) dans le deuxième essai, à malheureusement conduit à l'hydrolyse de l'hydroxamate et nous avons isolé l'acide ES 241 de façon quantitative.

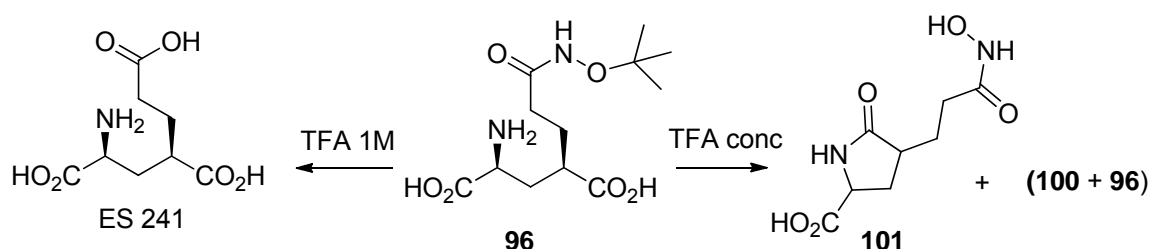


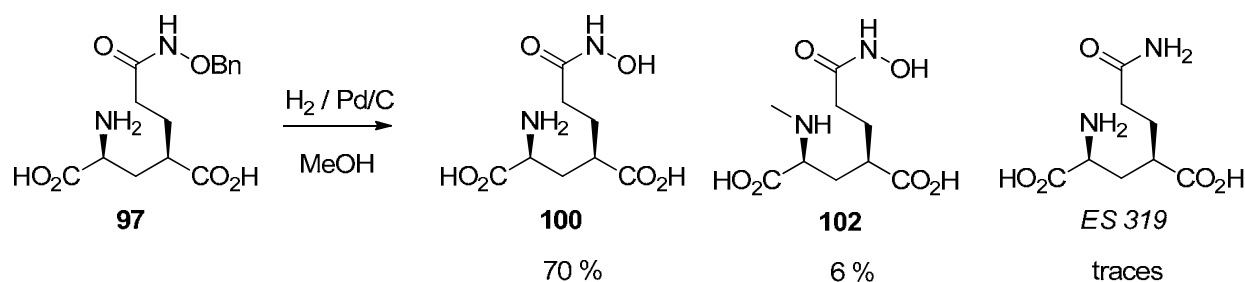
Schéma 171 : essai de déprotection de l'hydroxamate 96.

A ce stade, nous avons décidé de concentrer nos efforts sur la déprotection du dérivé benzylé.

2.2.7.2 Déprotection de l'hydroxamate 97

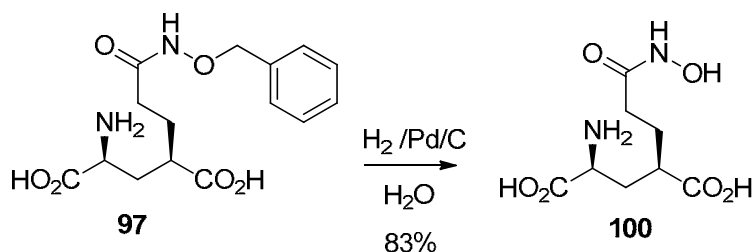
Le groupement benzyle présente l'avantage d'être facilement éliminé par hydrogénation. Toutefois, il existe un risque mineur de coupure de la liaison N-O.

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'hydrogénation de l'hydroxamate **97** dans le MeOH. L'analyse du milieu réactionnel avant purification a bien montré l'élimination du groupement benzyle et la formation de l'hydroxamate **100**. Cependant nous avons aussi détecté la présence d'une trace d'amide ES 319 due à la coupure de la liaison N-O. Nous avons aussi pu mettre en évidence la formation du composé méthylé **102**. Après purification sur Dowex 1, l'hydroxamate **100** a été obtenu avec un rendement de 70 % mais toujours accompagné du composé **102** avec un pourcentage de 6 % déterminé par RMN.

Schéma 172 : hydrogénation d'hydroxamate **97** dans le MeOH.

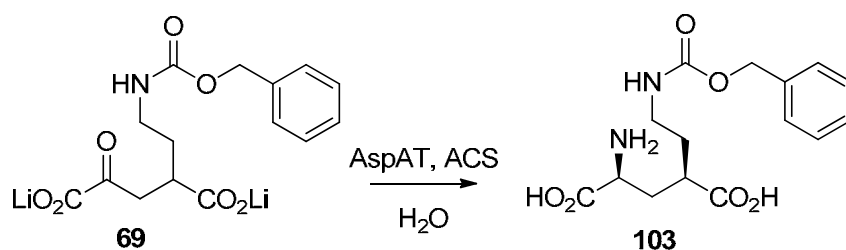
Il est probable que le composé **102** ait été formé via une amination réductrice avec du formaldéhyde formé par oxydation du MeOH catalysée par le Pd.

Pour éviter la formation du composé **102**, nous avons donc réalisé la réaction d'hydrogénation dans l'eau. L'analyse du milieu réactionnel avant purification a encore montré la présence d'une faible quantité d'amide *ES 319* (<2 %) mais aucune trace du produit méthylé **102**. La purification sur la résine basique a permis d'isoler l'hydroxamate **100** avec un rendement de 83 % et une pureté de 98 % (déterminé par HPLC à 225 et 210 nm).

Schéma 173 : hydrogénation de l'hydroxamate **97** dans H₂O.

2.2.8 Synthèse du carbamate **103** et déprotection

Comme nous l'avons vu le carbamate **69** est un très bon substrat de l'AspAT. La réaction de transamination et la purification ont été réalisées sans difficulté selon le protocole standard. Le produit **103** a été ainsi isolé avec un rendement de 40 %.

Schéma 174 : Synthèse du composé **103**.

La déprotection de la fonction amine a été réalisée par hydrogénation catalytique (schéma 175).

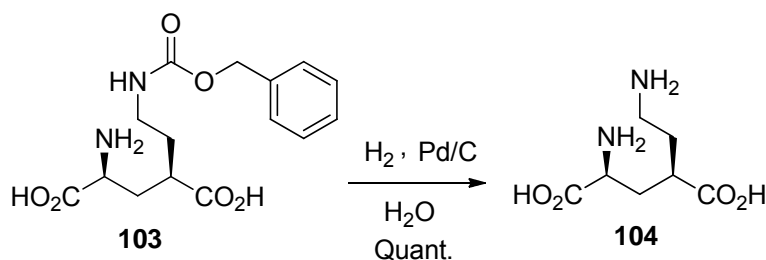


Schéma 175 : déprotection du composé **103**.

Après filtration du catalyseur, le milieu réactionnel a été déposé sur une colonne de résine basique. Il est à noter que la diamine **104** ne s'adsorbe pas sur la résine basique en raison de son caractère doublement zwitterionique. Une simple élution à l'eau a permis d'isoler le produit **104**, isolé avec un rendement quantitatif et une bonne pureté.

La diamine **104** est en fait une chimère entre le Glu et la lysine. Son dérivé protégé au niveau de la fonction amine en position α devrait permettre d'accéder à une collection d'amides et d'urées. La fonction amine peut aussi être convertie en azoture qui pourra ensuite être engagé dans des réactions de type "chimie click". Cependant, par manque de temps, nous n'avons pas pu étudier la synthèse des ces différents dérivés.

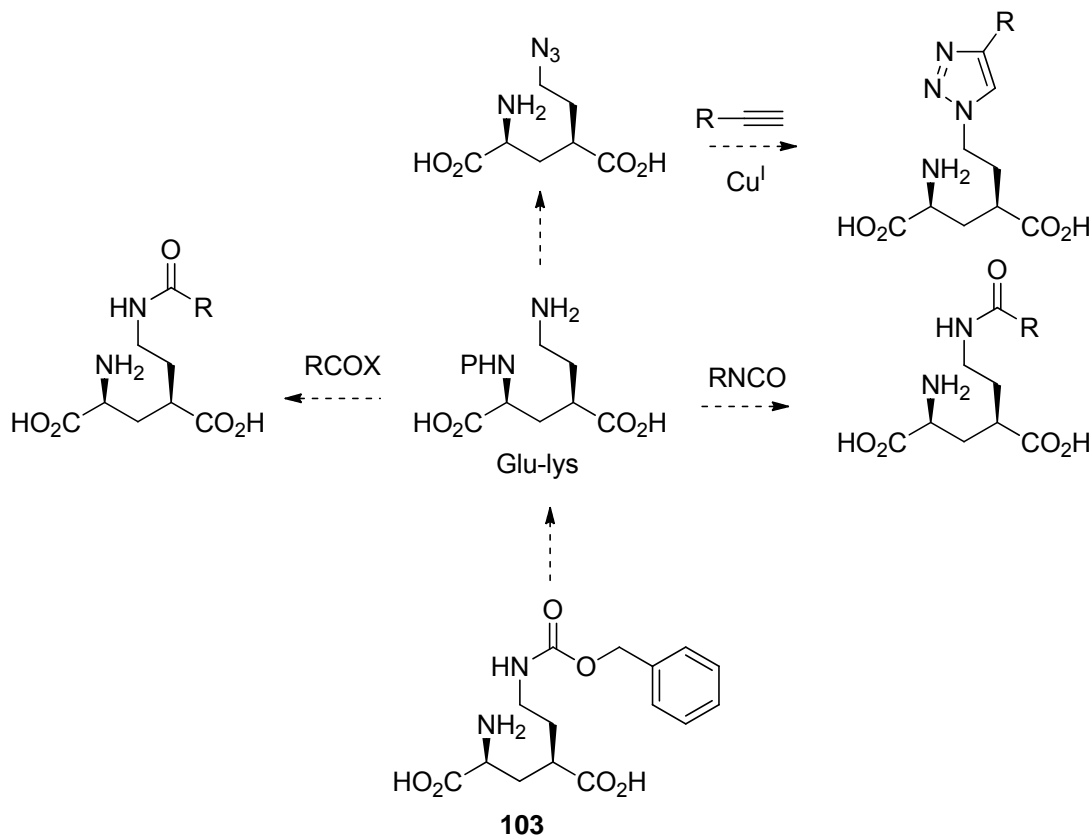


Schéma 176 : perspectives à partir de l'analogue **103**.

2.2.9 Préparation du nitrile **105** et de ses dérivés

2.2.9.1 Synthèse du dérivé nitrile **105**

Comme dans les cas précédents, à l'issue de la réaction de transamination, le milieu réactionnel a été directement déposé sur la résine basique pour éviter l'hydrolyse de la fonction nitrile en présence d'ammoniaque. L'analogue **105** a été obtenu sans difficulté avec un rendement de 40 %.

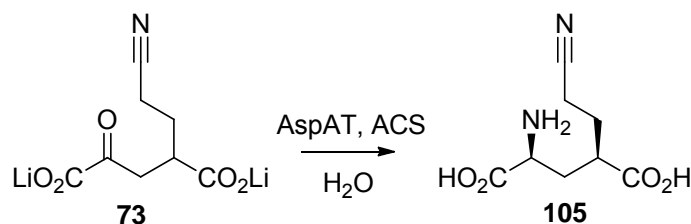


Schéma 177 : synthèse de l'analogue du Glu **105**

Le composé **105** présente un grand intérêt. En effet, la fonction nitrile peut être convertie en tétrazole donnant accès à un analogue du dérivé acide ES 241. De plus, la réduction du nitrile peut conduire à un analogue diaminé qui comme le produit **104** constitue un précurseur pour la préparation de nombreux dérivés.

2.2.9.2 Réduction de la fonction nitrile

Nous avons choisi l'hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon pour la réduction de la fonction nitrile. Au cours d'un premier essai à petite échelle (14 mg), la réaction a été arrêtée après une heure malgré la présence résiduelle d'une légère quantité de produit **105** observée par CCM. L'analyse du milieu réactionnel après concentration a montré en plus de la diamine **106**, la présence de l'azépane **107**. Le mélange a été déposé sur une résine basique Dowex 1. Comme dans le cas de l'analogue du Glu **104**, la diamine **106** n'a pas été retenue sur la résine basique et a été simplement éluée avec H_2O . L'azépane **107**, quant à lui, est bien fixé sur la résine et une élution avec un gradient d'AcOH a permis de le décrocher. Les deux produits ont été isolés avec des rendements respectifs de 35 % et 23 %.

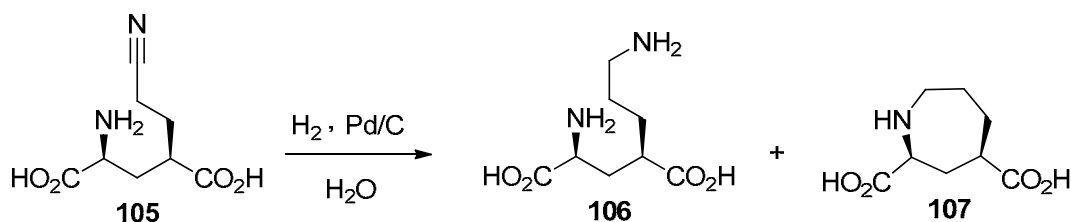


Schéma 178 : essai d'hydrogénation sur petite quantité du nitrile **105**.

La réaction a été ensuite reproduite sur une plus grande quantité (160 mg). Malgré des ajouts successifs de catalyseur, nous avons observé une disparition très lente du nitrile qui n'a été complète qu'après 4 jours. L'analyse du milieu réactionnel par RMN a montré la présence de la diamine **106** et de l'azépane **107** mais a également montré la présence de signaux qui peuvent correspondre aux diastéréoisomères *anti* résultant vraisemblablement d'une épimérisation partielle au niveau du carbone α via l'oxydation réversible de l'amine. En effet ce type d'épimérisation en présence de charbon palladié a déjà été décrit dans la littérature.²⁵⁷

Après purification sur résine basique, la diamine **106** a été obtenue avec un rendement de 33 % et un excès diastéréoisomérique de 72 %. L'azépane **107** a été isolé avec un rendement de 56 % et un excès diastéréoisomérique de 90 %.

Une séparation des diastéréoisomères a été envisagée. L'utilisation d'une colonne de résine basique de plus grande taille nous a permis d'observer, dans le cas de l'azépane une séparation partielle et d'isoler des fractions contenant l'isomère *syn* avec une bonne pureté (ed > 98 %). Nous n'avons cependant pas pu purifier la diamine malgré plusieurs essais.

Nous avons aussi essayé de réduire le temps de réaction en effectuant l'hydrogénation sous pression. La réaction a été arrêtée après 2 jours d'agitation sous une pression de H₂ de 6 bars. L'analyse du milieu réactionnel a montré un taux d'isomérisation de 3 %. Dans ce cas, après purification sur résine basique l'azépane **107** a été isolé avec un rendement de 42 % et une bonne pureté (ed > = 98 %). La diamine **106** a été isolée avec un rendement de 58 % et un excès diastéréoisomérique de 97 % (déterminé par RMN). Il est donc clair qu'en réalisant la réaction sous pression, on peut réduire l'épimérisation, mais aussi limiter la réaction de cyclisation.

Afin d'éviter les 2 problèmes que constituent la cyclisation et l'épimérisation, nous avons envisagé la protection de la fonction amine en position α du composé **105**. Nous avons choisi le groupement BOC.

2.2.9.3 Protection de l'analogue du Glu **105**

La protection de l'analogue du Glu **105** par un BOC a été réalisée selon la méthode classique dans l'eau et en présence de BOC₂O et de NaHCO₃. Après une purification sur

²⁵⁷ Y. K. Choi, M. J. Kim, Y. Ahn, M.-J. Kim *Org. Lett.* **2001**, 3, 4099-4101.

résine basique équilibrée avec des ions bicarbonates et une élution au bicarbonate d'ammonium, le composé **108** a été obtenu avec un rendement de 94 %.

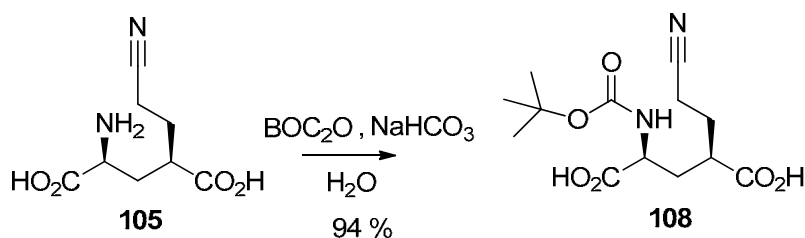


Schéma 179 : synthèse du composé **108**.

2.2.9.4 Hydrogénation du composé **108**

L'hydrogénation a été réalisée sous pression d'hydrogène et en présence de charbon palladié. Bien qu'elle soit incomplète, la réaction a été arrêtée après 24 heures d'agitation à température ambiante. Après purification sur résine basique (équilibrée avec des ions acétates), le produit **109** a été isolé avec une très bonne pureté mais un rendement de seulement 50 %.

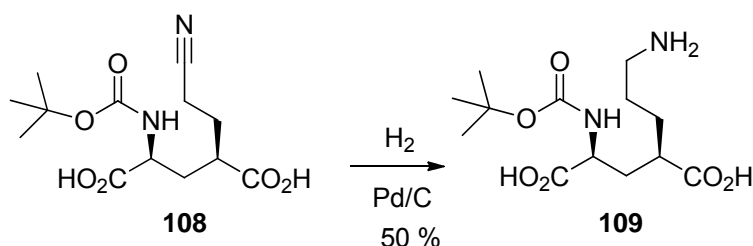
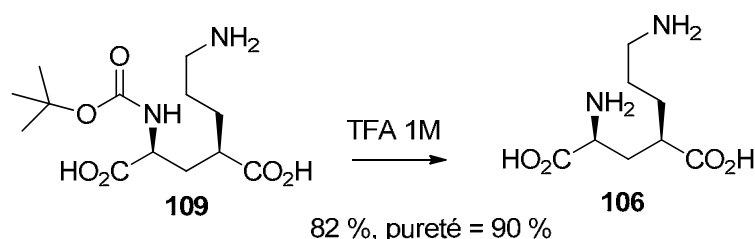


Schéma 180 : hydrogénation du composé **108**.

Il apparaît donc que cette réaction est lente. Il conviendra donc d'essayer d'autres catalyseurs afin de l'optimiser. Le composé **109** offre la perspective d'accéder à de nombreux dérivés par réaction de la fonction amine avec une variété d'électrophiles.

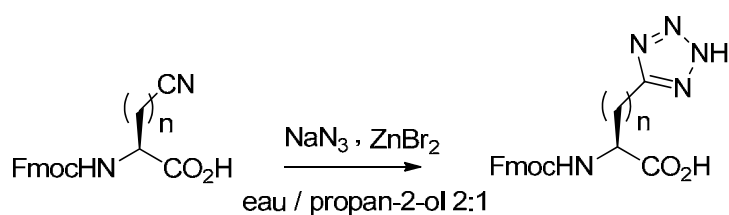
2.2.9.5 Déprotection du composé **109**

La déprotection de la fonction amine a été réalisée en présence de TFA 1M. Un simple passage sur résine basique (équilibrée avec des ions acétates) a permis d'obtenir la diamine **106** avec un rendement de 82 % mais avec une pureté modeste de l'ordre de 90 % (déterminée par RMN du proton). Par manque de temps, nous n'avons pas pu effectuer d'autres essais pour optimiser cette étape.

Schéma 181 : déprotection du composé **108**.

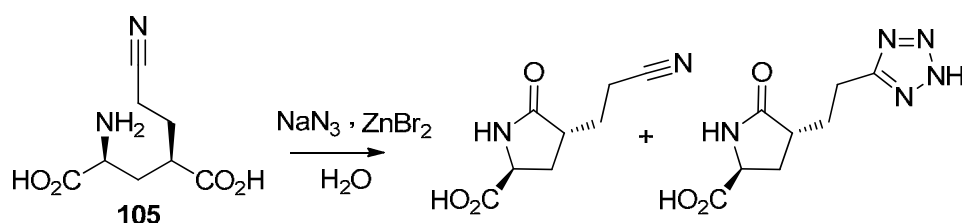
2.2.10 Synthèse du dérivé tétrazole

Afin de convertir le nitrile **105** en tétrazole, nous avons essayé une méthode décrite qui consiste à traiter le nitrile par NaN_3 en présence de ZnBr_2 (schéma 182).²⁵⁸

Schéma 182 : méthode décrite dans la littérature pour la préparation d'un tétrazole.²⁵⁸

2.2.10.1 Synthèse du tétrazole à partir du composé **105**

Nous avons mis en œuvre un premier essai sans protection de la fonction amine du composé **105**. Après chauffage à 80 °C pendant une nuit. Le milieu réactionnel a été déposé sur une résine acide puis une élution à l'ammoniaque a été faite. L'analyse des différentes fractions a permis de mettre en évidence la formation de 2 dérivés pyroglutamate correspondant au produit de départ **105** et au tétrazole souhaité. Nous avons donc envisagé de protéger le composé **105** avant la réaction de cycloaddition.

Schéma 183 : tentative de synthèse du tétrazole à partir du nitrile **105**.

²⁵⁸ V. V. Sureshababu, S. A. Naik, G. Chennakrishnareddy *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 7038-7040.

2.2.10.2 Synthèse du tétrazole à partir du composé 109

Nous avons utilisé le composé **109** synthétisé précédemment pour tenter de préparer le tétrazole. Cependant après chauffage à 80°C, la perte du groupement BOC a été observée avant la réaction de cycloaddition.

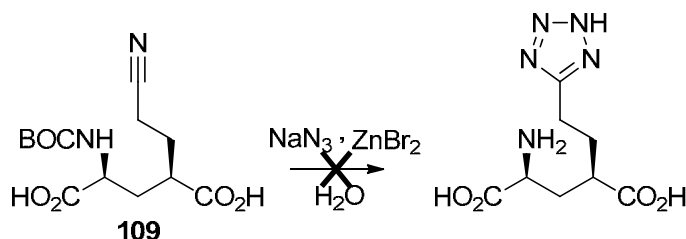


Schéma 184 : tentative de synthèse du tétrazole à partir du nitrile **109**.

Nous nous sommes donc tournés vers la protection du dérivé **105** avec un groupement Fmoc afin de reproduire les conditions décrites dans la littérature.

2.2.10.3 Protection du composé 105 par le groupement Fmoc

La protection de l'analogue **105** avec le groupement Fmoc a été réalisée selon une méthode décrite dans la littérature en présence de Fmoc-Cl.²⁵⁹ Après une agitation à température ambiante pendant une nuit, le milieu est déposé sur une résine basique QAE sephadex équilibrée avec des ions bicarbonate. Une élution au bicarbonate d'ammonium a permis d'isoler le produit **110**, avec un rendement de 86 %.

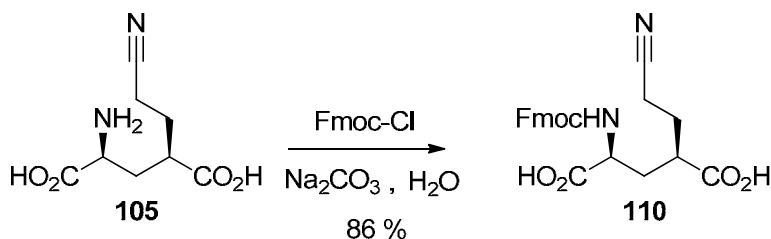


Schéma 185 : protection du composé **105** avec un groupement Fmoc.

2.2.10.4 Synthèse du tétrazole à partir composé 110

Nous avons essayé les mêmes conditions que précédemment, mais malheureusement après chauffage à reflux pendant une nuit, une dégradation du produit a été observée et a conduit à un mélange de produits complexe et difficile à analyser.

²⁵⁹ L. A. Carpino; G. Y. Han *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.

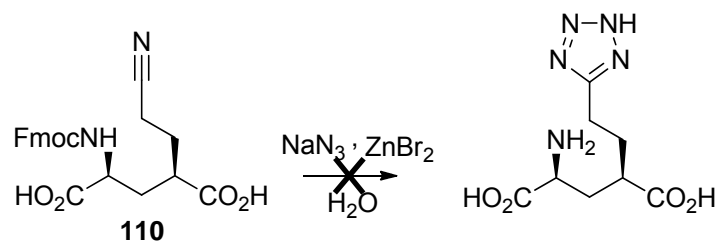


Schéma 186 : tentative de synthèse du tétrazole à partir du composé **110**.

Tenant compte de ces résultats et par manque de temps, nous n'avons pas poursuivi cette étude. D'autres conditions restent, bien sûr, à essayer, notamment une méthode décrite dans la littérature qui consiste à utiliser le NaN_3 en présence d'acétate de triéthylammonium avec la fonction amine protégée par le groupement BOC.²⁶⁰ Il sera peut-être aussi intéressant d'essayer divers solvants ou encore de protéger les fonctions acides du dérivé **105**.

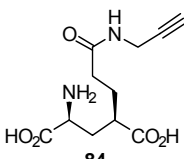
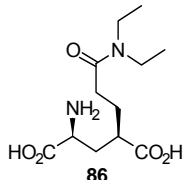
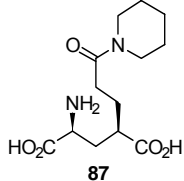
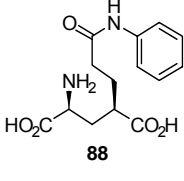
²⁶⁰ K.-y. Hung, P. W. R. Harris, M. A. Brimble *Synlett* **2009**, 1233-1236.

Chapitre 3 Evaluation des propriétés biologiques des analogues du Glu

Bien que l'évaluation des propriétés pharmacologiques des analogues du Glu que nous avons préparés ne soit pas complète à ce jour, certaines molécules ont déjà fait l'objet de tests pharmacologiques sur différents transporteurs et récepteurs du système Glutamatergique. Comme nous l'avons déjà évoqué, ces études pharmacologiques ont été effectuées à l'Université de Copenhague, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. L.Bunch et du Dr. A.A.Jensen.

3.1 Etudes de l'interaction des analogues du Glu avec les EAATs

L'activité inhibitrice des analogues du Glu sur les EAAT1-3 a été évaluée selon les deux tests décrits précédemment (Travaux antérieur, page 130). Le tableau suivant présente les valeurs disponibles à l'heure actuelle pour certains analogues.

Ligand	K _i = inhibiteur (μL)		
	EAAT1	EAAT2	EAAT3
 84	>300	>300	>300
 86	>300	>300	>300
 87	>300	>300	>300
 88	>300	>300	>300

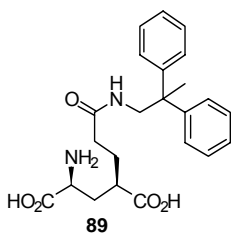
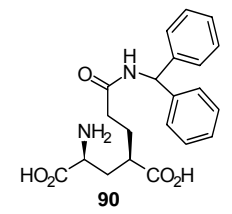
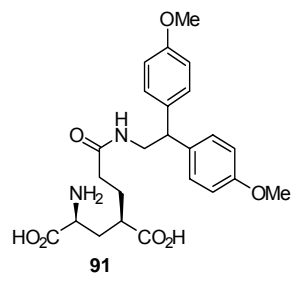
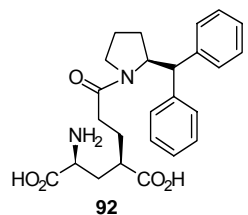
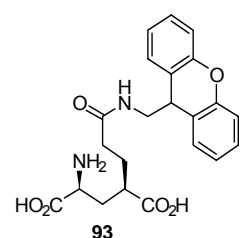
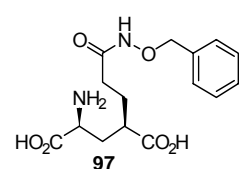
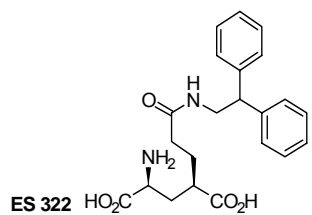
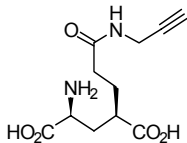
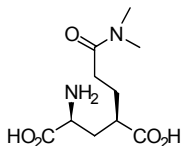
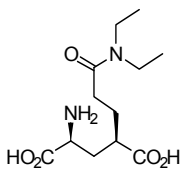
 <p>89</p>	>1000	>100	>1000
 <p>90</p>	>1000	>100	>1000
 <p>91</p>	>1000	60	>1000
 <p>92</p>	>1000	>100	>1000
 <p>93</p>	>1000	>100	>1000
 <p>97</p>	>1000	~300	>1000
 <p>ES 322</p>	~1000	75	~1000

Tableau 16 : Interactions entre les transporteurs du Glu EAAT1-3 et certains analogues du Glu préparés au cours de cette thèse.

Les amides **84** à **88** se comportent comme des inhibiteurs avec une très faible affinité et aucune sélectivité pour les 3 sous-types des EAATs. Les analogues du Glu fonctionnalisés en position 4 par des groupements volumineux et hydrophobes présentent une faible sélectivité pour le sous-type EAAT2 et seul le composé **91** présente une affinité ($IC_{50} = 60 \mu M$) du même ordre que celle trouvée avec le composé de référence ES 322 ($IC_{50} = 75 \mu M$). Ce résultat montre que la substitution des noyaux aromatiques par des groupements méthoxy ne perturbe pas la liaison au transporteur EAAT2. Les différentes modifications que nous avons faites à partir de la structure du dérivé ES 322 n'ont donc pas permis d'augmenter l'affinité et la sélectivité vis-à-vis du sous-type EAAT2. Dans la série hydroxamate, seul le composé **97** a été testé vis-à-vis des trois sous-types de EAATs, ce produit montre lui aussi une faible activité inhibitrice pour EAAT2 ($IC_{50} = 300 \mu M$).

3.2 Interaction des analogues du Glu avec les iGluRs

Certains analogues du Glu ont également été évalués vis-à-vis des iGluRs et sur les différents types de sous-unités des KARs en mettant en œuvre les tests déjà décrits dans la partie bibliographique. Les résultats pharmacologiques obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous ainsi que les résultats obtenus précédemment avec les composés de référence ES 319 et ES 287.

Ligand	iGluR $IC_{50}(\mu M)$			sous-unités des KARs Ki (nM)		
	AMPA	KA	NMDA	GluK1	GluK2	GluK3
84 	19	35	40	96	14000	190
85 	n.t.	n.t.	n.t.	37	>100	5400
86 	67	29	>100	410	8600	3300

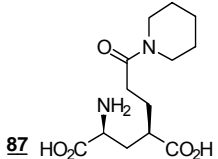
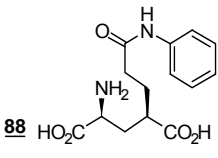
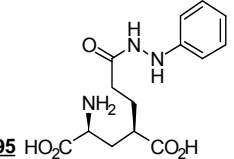
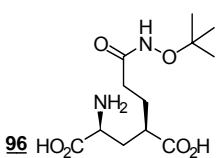
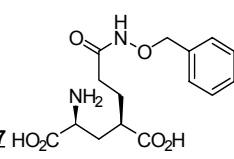
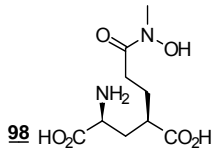
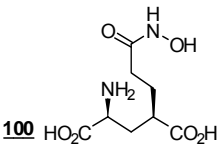
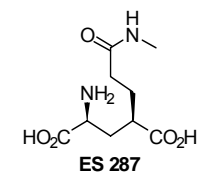
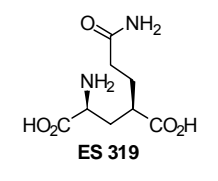
 <p>87</p>	55	50	>100	600	31000	5800
 <p>88</p>	57	77	>100	140	35000	4700
 <p>95</p>	n.t.	n.t.	n.t.	380	>100	5600
 <p>96</p>	n.t.	n.t.	n.t.	3200	>100	44000
 <p>97</p>	n.t.	n.t.	n.t.	820	28000	2810
 <p>98</p>	n.t.	n.t.	n.t.	3,4	700	120
 <p>100</p>	n.t.	n.t.	n.t.	13	3300	240
 <p>ES 287</p>	32	29	>100	3,81	123	57,3
 <p>ES 319</p>	25	16	>100	7,45	9960	2830

Tableau 17 : affinité des analogues du Glu pour les iGluRs et vis-à-vis des sous-unités iGluR5-7.

A l'exception du composé **84**, les différents analogues ont montré une sélectivité pour les récepteurs non NMDARs natifs. Comme pour les produits de référence ES 319 et ES 287, une sélectivité vis-à-vis du sous-type GluK1 a été retrouvée pour les amides **84-88**. L'analogue **84** a cependant montré des affinités voisines pour GluK1 et GluK3. La comparaison des résultats obtenus avec le diméthylamide **85** et le méthylamide ES 287 montre que la substitution de l'hydrogène par un méthyle diminue l'affinité mais augmente la sélectivité vis-à-vis de GluK1. L'introduction de groupements plus volumineux sur l'atome d'azote diminue encore l'affinité mais préserve la sélectivité vis-à-vis de GluK1. Une faible affinité et une sélectivité pour GluK1 ont été aussi observées avec l'hydrazide **95** et pour l'hydroxamate benzylé **97**. Le N-méthyl-hydroxamate **98** a montré une très bonne affinité et une bonne sélectivité pour GluK1 ($K_i = 3,4$ nM) du même ordre que celles mesurées avec le méthylamide ES 287. Enfin, l'hydroxamate **100** comme l'amide primaire ES 319 a montré une bonne affinité pour GluK1, et une activité très faible vis-à-vis de GluK2. Cependant il conserve une faible affinité ($K_i = 240$ nM) pour GluK3.

Compte tenu du caractère incomplet de ces résultats il est à ce jour difficile de tirer des conclusions et de souligner l'intérêt potentiel des molécules que nous avons préparé. L'obtention prochaine de résultats concernant notamment les mGluRs devraient nous permettre de mieux cerner la sélectivité d'action de nos molécules.

Chapitre 4 Synthèse de la phosphinothricine et de ses dérivés

4.1 Introduction

La phosphinothricine (PPT) ou glufosinate d'ammonium (sel d'ammonium de la PPT) est le principe actif d'un herbicide à large spectre initialement commercialisé par la société BAYER sous le nom de BASTA®. Cet herbicide est utilisé pour le contrôle des mauvaises herbes dans de nombreuses cultures, des vergers et des vignes. Il est également utilisé pour le défanage de certaines cultures telles que les pommes de terre afin de faciliter leur récolte.

La cible de la PPT est la glutamine synthétase (GS) des plantes. En effet la fonction principale de cette enzyme est la détoxification de l'ammoniac qui provient du sol ou du catabolisme des acides aminés. Cette enzyme catalyse la conversion du Glu en Gln en présence d'ATP (**schéma 187**).

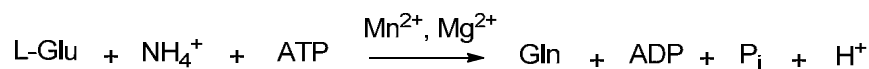


Schéma 187 : transformation du Glu en Gln catalysée par la GS.

Il a été montré qu'une ingestion de PPT involontaire ou lors de tentatives de suicide, peut provoquer des convulsions ainsi qu'une amnésie sévère.^{261, 262} Une inhibition de la GS mène à un déficit en glutamine et à une accumulation du Glu dans les astrocytes et dans la fente synaptique, ce qui conduit à des phénomènes excitotoxiques.^{263, 264}

De nombreuses plantes OGMs résistantes à la PPT ont été développées et sont cultivées dans de nombreux pays (Canada, Etats-Unis, Allemagne, Portugal, Argentine et Roumanie). Ces plantes résistent à la PPT, en transformant la PPT en PPT-N-acétylée (NAPPT) qui n'inhibe plus la GS et n'est donc pas toxique pour la plante. Cette résistance à la PPT est obtenue par intégration à la plante d'un gène qui code pour l'enzyme phosphinothricine-N-acétyltransférase qui catalyse la réaction de N-acétylation de la PPT. Les plantes OGMs résistantes sont donc susceptibles d'absorber de la PPT et d'accumuler la NAPPT.

De plus la PPT et la NAPPT peuvent être métabolisées par la plante et transformées en différentes molécules. Il a été montré que des cellules en culture provenant de plantes transgéniques ou non, métabolisent la PPT principalement en α -cétoacide (PPTO), α -hydroxy-

²⁶¹ T. Watanabe, T. Sano *Hum. Exp. Toxicol.* **1998**, 17, 35-39.

²⁶² H. Y. Park, P. H. Lee, D. H. Shin, G. W. Kim *Neurology* **2006**, 67, 914-915.

²⁶³ J. H. Laake, T. A. Slyngstad, F. M. Š. Haug, O. P. Ottersen *J. Neurochem.* **1995**, 65, 871-881.

²⁶⁴ J. S. B. C.A. Shaw, B.A. Pasqualotto, and K. Curry *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1999**, 77, 871-877.

acide (PPTOH), acide 3-(hydroxyméthylphosphinyl)propanoïque (MPPA) et en acide 3-(hydroxyméthylphosphinyl)acétique (MPAA). Ces métabolites de la PPT sont susceptibles de se retrouver dans l'alimentation animale et humaine. A l'heure actuelle, aucune étude n'a clairement démontré l'innocuité de la NAPPT et de ses métabolites pour les animaux et l'homme.

Des études effectuées au sein du laboratoire de Neurobiologie de l'Université d'Orléans ont montré une action épileptogène de la PPT. En effet, les études comportementales et électroencéphaliques ont montré que des souris développent des crises tonico-cloniques et des convulsions, après une injection intra-péritonéale de PPT à la dose de 75 mg/kg sans inhiber la GS *in vivo*.²⁶⁵ Ceci permet de supposer que la PPT provoque des crises par le biais d'un mécanisme différent. Il se peut aussi qu'un des métabolites de la PPT soit responsable du déclenchement des crises en agissant sur la GS ou sur d'autres cibles. L'administration du MK-801 (antagoniste sélectif des NMDARs) empêche l'apparition des crises d'épilepsie observée suite à l'administration de PPT. Ce résultat montre l'implication plus ou moins directe des GluRs dans la toxicité de la PPT. Il a été aussi montré que les crises d'épilepsie induites par la PPT provoquent une astrogliose (prolifération des cellules astrocytaires) et une mort neuronale. Dans le cadre du projet ANR Herbitox (2006-2009), un traitement chronique à faible dose de PPT a été effectué chez la souris dans le but de mimer l'intoxication des agriculteurs ou des consommateurs. Des résultats récents ont montré un léger déficit d'apprentissage après le traitement des souris à la PPT pendant 10 semaines à la dose de 5 ou 10 mg/kg, 3 fois par semaine.²⁶⁶ Une altération de la structure de l'hippocampe a été observée chez ses souris par une étude IRM (imagerie par résonance magnétique) et une augmentation de l'activité GS a été observée. De plus, une astrogliose modérée mais pas de neurodégénérescence a été observée chez ses souris.²⁶⁷ Il est à noter que la PPT utilisée est disponible dans le commerce sous sa forme racémique. Cependant, seule la L-PPT inhibe la GS. Dans le cadre du projet ANR Herbitox, notre tâche a concerné la synthèse de la PPT énantiomériquement pure (forme D et L) et de ses métabolites afin d'étudier la toxicité de ses différents composés, leur action sur la GS et leur activité épileptogène.

²⁶⁵ E. Lapouble, C. Montécot, A. Sevestre, J. Pichon *Brain Res.* **2002**, 957, 46-52;

²⁶⁶ A.-G. Calas, O. Richard, S. Mème, J.-C. Beloeil, B.-T. Doan, T. Gefflaut, W. Mème, W. E. Crusio, J. Pichon, C. Montécot *NeuroToxicology* **2008**, 29, 740-747.

²⁶⁷ S. Mème, A.-G. Calas, C. Montecot, O. Richard, H. Gautier, T. Gefflaut, B. T. Doan, W. Mème, J. Pichon, J.-C. Beloeil *Toxicol. Sci.* **2009**, 111, 321-330.

Nous nous sommes aussi intéressés au marquage isotopique de la PPT dans le but de mettre au point une méthode de radiomarquage qui pourrait être utile dans le cadre de futures études pharmacologiques.

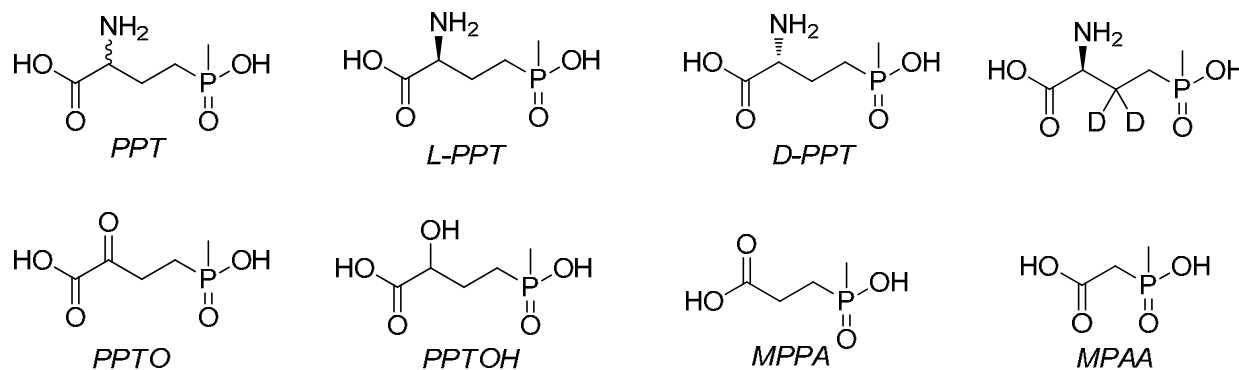


Figure 61 : L-PPT, métabolites et dérivés.

4.2 Préparation de la PPT et de ses métabolites

4.2.1 Purification de la PPT

La PPT racémique a été obtenue à partir d'un herbicide commercial contenant 200 g.L⁻¹ de Glufosinate d'ammonium ainsi qu'un tensioactif et un colorant. La purification sur résine acide (Dowex 50) a permis d'isoler la PPT avec un rendement de 93 % et une excellente pureté.

4.2.2 Synthèse du PPTO

Les aminoacides peuvent être convertis en α -cétoacides par réaction avec une quantité stoechiométrique de pyridoxal en présence de CuCl₂.²⁶⁸ Dans notre cas, cette réaction s'est révélée inefficace. Cependant, l'utilisation de pyridoxal phosphate (PLP), le cofacteur des ATs, a permis d'obtenir le PPTO. Ce dernier a pu être purifié par un passage sur résine acide (Dowex 50) et isolé avec un bon rendement de 83 % et une excellente pureté. L'analyse par RMN dans l'acétone deutérée montre la présence des deux formes cétone et énol dans un rapport 87/13. Cet équilibre céto-énolique du PPTO a été déjà décrit dans la littérature.²⁶⁹

²⁶⁸ K. Hasenkopf, M. Pischetsrieder *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 5697-5703

²⁶⁹ H. J. Zeiss *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 1783-1788

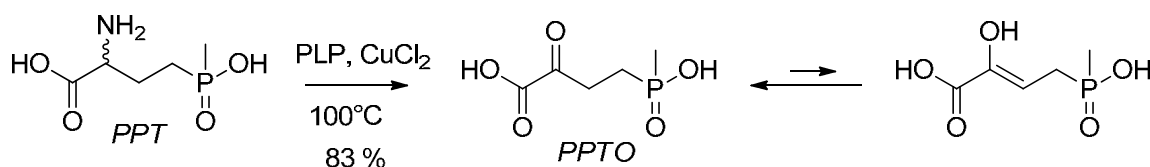
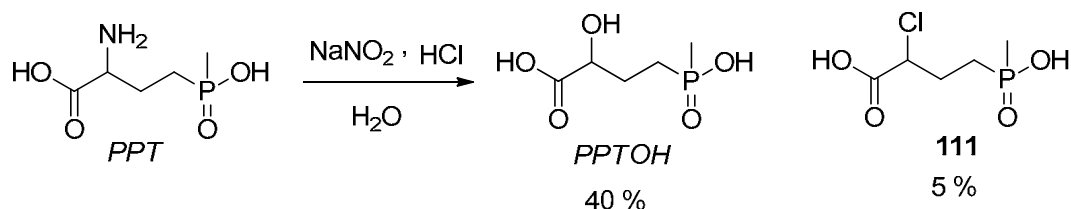


Schéma 188 : préparation du PPTO.

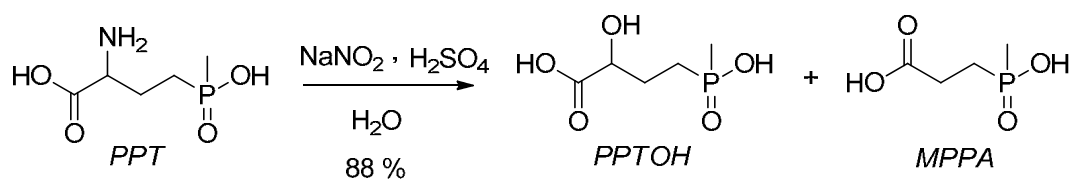
4.2.3 Synthèse du PPTOH

Nous avons envisagé une réaction de désamination nitreuse à partir de la PPT pour préparer le PPTOH. La réaction de substitution d'un groupement amine par un groupement hydroxyle via la formation d'un diazonium est réalisée en présence de nitrite de sodium en milieu acide.

Nous avons dans un premier temps, réalisé la désamination en présence de NaNO₂ et de HCl. Après adsorption sur résine basique (Dowex 1) et élution avec une solution aqueuse de TFA, le PPTOH a été isolé avec un faible rendement (40 %) et contaminé par un produit, difficile à identifier, représentant environ 10 % du mélange (pourcentage molaire estimé par RMN). Nous avons aussi isolé le dérivé chloré **111** avec un rendement de 5 %.

Schéma 189 : préparation du PPTOH en présence de NaNO₂ et de HCl.

Nous avons effectué un deuxième essai en présence d'acide sulfurique. Le PPTOH a été isolé dans ce cas avec un rendement de 88 %. L'analyse par RMN a de nouveau montré une pureté d'environ 90 % et la présence de signaux pouvant correspondre au composé MPPA (schéma 190).

Schéma 190 : préparation de PPTOH en présence de NaNO₂ et de H₂SO₄.

Pour confirmer la présence du MPPA et purifier le PPTOH, nous avons envisagé une estérification du PPTOH et du MPPA en introduisant des groupements benzyle. Nous avons choisi une méthode qui met en œuvre l'isourée **112** obtenue par addition de l'alcool benzylique au N,N diisopropylcarbodiimide (DIC) et en présence de CuCl_2 .²⁷⁰

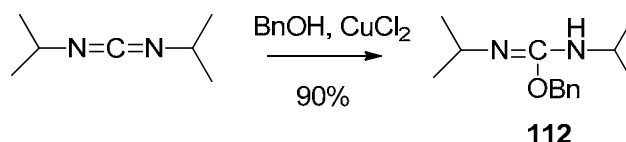


Schéma 191 : synthèse de l'isourée **112**.

Le traitement du mélange PPTOH + MPPA avec l'isourée **112** a permis, après purification par chromatographie sur gel de silice d'isoler le PPTOH benzylé **113** avec un rendement de 13 % ainsi que le composé **114** avec un rendement de 2 %. En dépit des rendements faibles, cette expérience nous a permis de séparer les deux composés et d'identifier clairement le MPPA dans le mélange initial.

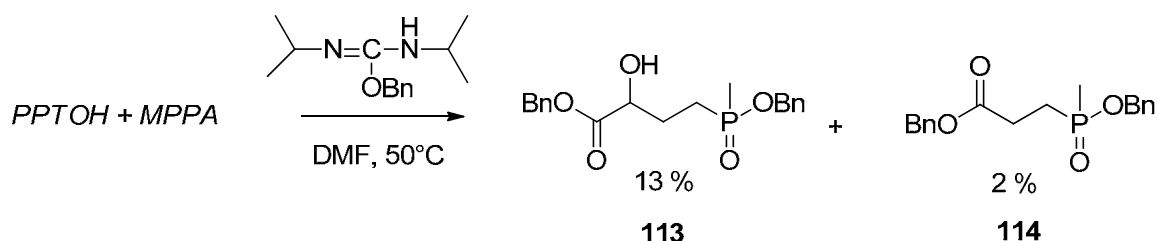
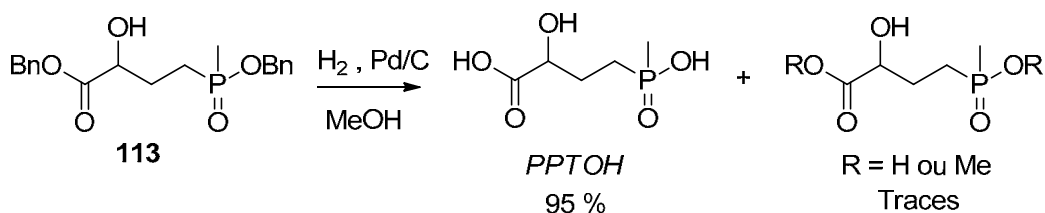


Schéma 192 : estérification et purification du PPTOH.

Nous avons, par la suite, envisagé une déprotection du composé **113** afin d'obtenir le PPTOH, en réalisant une hydrogénation catalytique en présence de charbon palladié dans le MeOH. Le PPTOH a bien été obtenu mais avec une pureté de 95 %. Nous avons en effet identifié des composés méthylés issus de réactions de transestérification. L'utilisation du THF devrait sans doute permettre d'éviter la formation des produits de transestérification. Cependant nous n'avons pas poursuivi dans cette voie.

²⁷⁰ A. Yamagishi; M. Szwarc *Macromolecules* **1978**, *11*, 504-506.

Schéma 193 : hydrogénolyse du composé **113**.

Purification du PPTOH sur résine QAE séphadex:

La séparation du PPTOH et du MPPA obtenus à l'issue de la réaction de désamination nitreuse a pu être optimisée en utilisant un autre support chromatographique: nous avons réalisé une purification sur résine basique QAE sephadex. Après adsorption du mélange réactionnel, une élution avec un gradient d'acide formique a permis une séparation efficace des deux métabolites PPTOH et AMPP. Cependant l'analyse par RMN du PPTOH a montré une pureté de 96 % due à la présence du produit de formylation **115**. Une hydrolyse en milieu basique (pH = 10) suivie d'une purification sur résine acide a permis de résoudre ce problème et d'isoler le PPTOH avec une très bonne pureté (> 99 %).

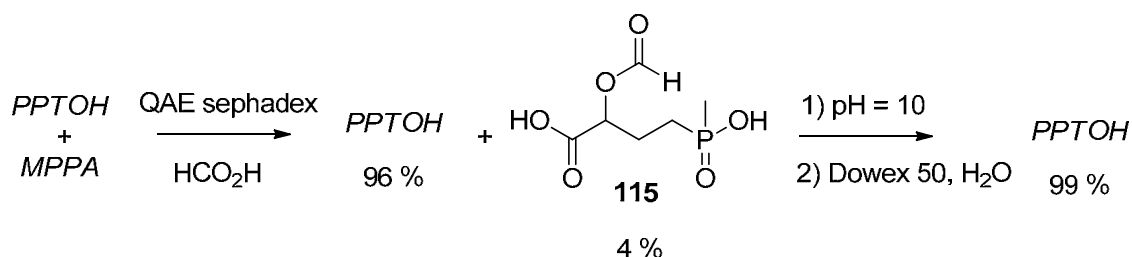


Schéma 194 : purification du PPTOH.

4.2.4 Synthèse du MPPA

Pour obtenir le composé MPPA, nous avons choisi une voie de synthèse décrite dans le schéma ci-dessous.

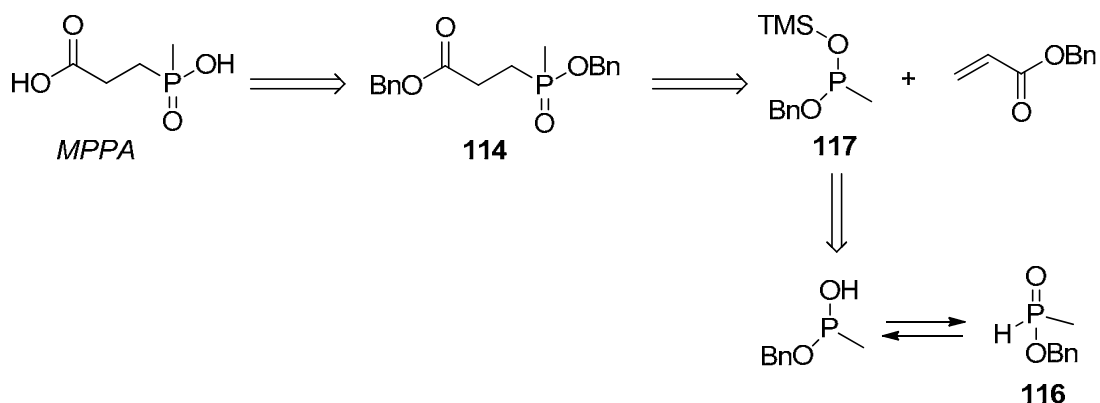


Schéma 195 : voie de synthèse envisagée pour préparer le MPPA.

Une addition conjuguée entre l'acrylate de benzyle et le phosphonite **117** obtenu à partir du H-phosphonate **116**, peut permettre d'accéder directement et simplement au composé **114**. Une hydrogénation catalytique des esters benzyliques permet ensuite d'obtenir le MPPA.

4.2.4.1 Synthèse du H-phosphonate **116**

Le H-phosphinate **116** a été préparé à partir de la dichlorométhylphosphine (MePCl_2) et de BnOH en présence de Et_3N selon une méthode décrite dans la littérature pour la synthèse du H-phosphinate éthylique (schéma 196).²⁷¹ Une filtration et une purification par chromatographie sur gel de silice a permis d'isoler le composé **116** avec un rendement de 61 %.

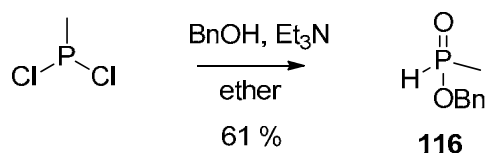


Schéma 196 : synthèse du H-phosphonate **116**.

Le MePCl_2 est un produit toxique et doit être manipulé avec beaucoup de précautions. Il est cependant possible d'utiliser le phosphinate d'ammonium ($\text{H}_2\text{PO}_2\cdot\text{NH}_4$) pour la préparation du H-phosphinate **116** avec un rendement de 46 %.²⁷² Par manque de temps nous n'avons pas essayé cette synthèse alternative.

4.2.4.2 Synthèse du composé **114**

Comme nous l'avons évoqué précédemment, une addition conjuguée doit permettre d'obtenir le composé **114**. Nous avons utilisé une méthode décrite dans la littérature pour la synthèse d'un autre phosphinate qui consiste à préparer un phosphonite silylé à partir d'un H-phosphonate et à le faire réagir sur un alcène activé.²⁷³ Le composé **116** a donc été transformé en phosphonite **117** par réaction avec le TMSCl en présence de Et_3N . Ce dérivé non isolé a ensuite réagi avec l'acrylate de benzyle. Une hydrolyse en milieu aqueux puis une purification par chromatographie ont permis d'isoler le composé **114** avec un rendement de 78 % (schéma 197).

²⁷¹ J. Kehler, B. Ebert, O. Dahl, P. Krogsgaard-Larsen *Tetrahedron* **1999**, 55, 771-780.

²⁷² E. L. Ravaschino, R. Docampo, J. B. Rodriguez *J. Med. Chem.* **2005**, 49, 426-435.

²⁷³ W. Froestl, P. A. Baumann, F. Brugger, C. Gentsch, J. Jaeke *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3297-3312.

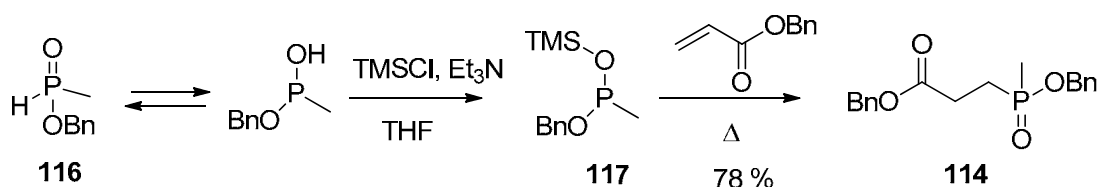
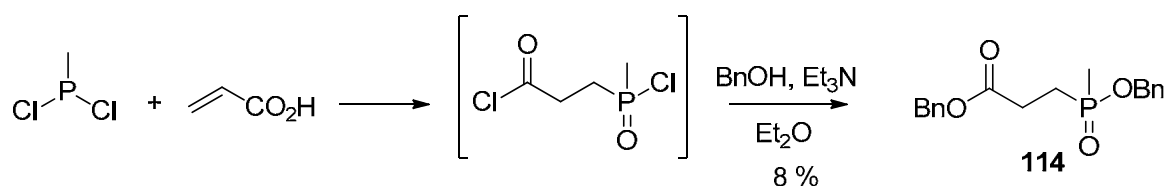


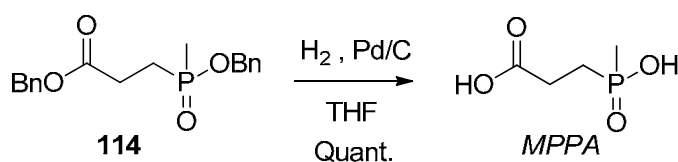
Schéma 197 : préparation du MPPA protégé.

Nous avons, en parallèle, essayé une méthode à priori plus directe pour accéder au composé **114**, en appliquant un autre protocole décrit dans la littérature pour la synthèse du diester méthylique.²⁷⁴ Après une addition conjuguée entre la dichlorométhylphosphine et l'acide acrylique, le chlorure d'acide est directement converti en diester en présence de BnOH et de Et₃N. Le composé **114** a été isolé après purification par chromatographie avec un rendement de seulement 8 % (schéma 198). Ce faible rendement peut sans doute être amélioré en répétant cette synthèse mais compte tenu des résultats obtenus avec le phosphonite **117**, nous n'avons pas poursuivi dans cette voie.

Schéma 198 : synthèse alternative du composé **114**.

4.2.4.3 Déprotection du composé **114**

L'hydrogénolyse des esters benzyles a été réalisée en présence de charbon palladié dans le THF afin d'éviter tout problème de transestérification et le MPPA a pu être ainsi isolé de façon quantitative avec une excellente pureté.

Schéma 199 : hydrogénolyse du composé **114**.

²⁷⁴ V. K. Khairullin, T. I. Sobchuk *J. Gen. Chem. USSR*. **1967**, 37, 666-669.

4.2.5 Préparation du MPAA

4.2.5.1 Synthèse du MPAA à partir du H-phosphonate 116

Pour préparer le dérivé MPAA, nous avons envisagé une approche similaire à la méthode précédente utilisée pour préparer le composé MPPA. Dans ce cas une réaction d'Arbuzov entre le phosphonite **117** et le bromoacétate de benzyle pourrait permettre d'accéder au composé **118** précurseur immédiat du MPAA (schéma 200).

Quelques exemples de réactions d'Arbuzov mettant en jeu une phosphonite silylée et un bromoacétate ont été décrits dans la littérature avec des rendements variables.^{275, 276} Dans notre cas, aucune réaction n'a été observée (schéma 200).

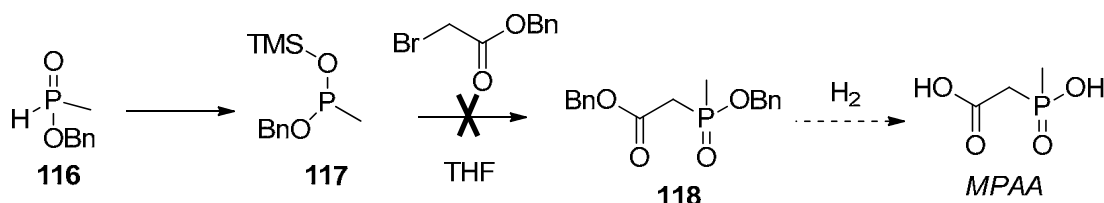


Schéma 200 : première approche envisagée pour préparer le métabolite MPAA.

Alternativement, nous avons essayé d'effectuer la substitution nucléophile mettant en jeu le phosphonite de sodium préparé en déprotonant le H-phosphonate **116** avec le NaH.²⁷³ Ici encore nous n'avons pas pu observer la formation du dérivé **118** (schéma 201).

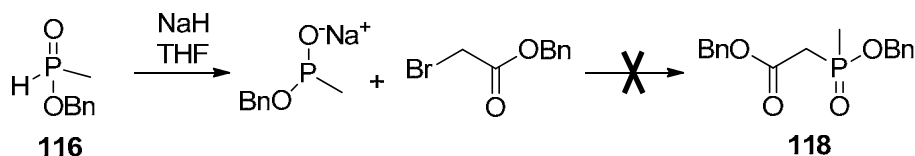


Schéma 201 : deuxième approche envisagée pour préparer le dérivé MPAA.

4.2.5.2 Synthèse du MPAA à partir du phosphonite 119

Nous avons par la suite envisagé de synthétiser le MPAA à partir du phosphonite dibenzylé **119** engagé dans une réaction d'Arbuzov avec le bromoacétate de benzyle. Le phosphonite **119** a été préparé à partir de MePCl₂ en présence de BnOH et de Et₃N. Après une agitation du mélange des trois réactifs pendant une nuit, le bromoacétate de benzyle a été ajouté. Le milieu a été agité à température ambiante pendant 2 jours puis une purification sur

²⁷⁵ W. P. Malachowski, J. K. Coward *J. Med. Chem.* **1994**, 59, 7625-7634.

²⁷⁶ J. K. Thottathil, C. A. Przybyla, J. L. Moniot *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 4737-4740.

colonne de silice à permis d'isoler le composé **118** avec un rendement de 9 %. Dans un deuxième essai le bromoacetate de benzyle a été ajouté après filtration et concentration du milieu contenant le phosphonite. Le composé **118** a été alors obtenu avec un rendement de 26 % (**schéma 202**). Ce faible rendement s'explique en partie par l'oxydation du phosphonite **119** en dibenzylphosphonate que nous avons isolé en dépit de nos efforts pour éviter la présence d'oxygène dans le milieu réactionnel.

Le MPAA a ensuite été obtenu avec un rendement quantitatif par hydrogénolyse des esters benzyliques selon le protocole déjà utilisé pour le composé **114** (**schéma 202**).

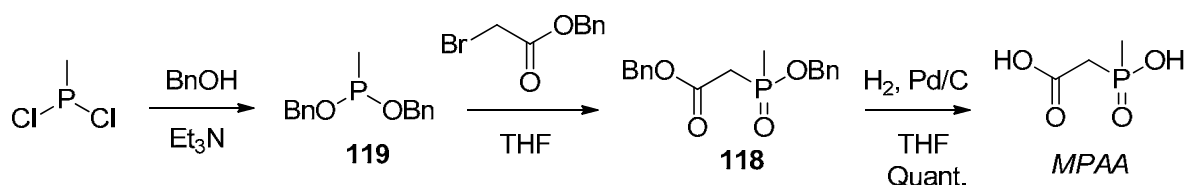


Schéma 202 : synthèse de MPAA.

4.2.6 Synthèse de la L-phosphinothricine

Travail antérieur : une étude de l'activité enzymatique de la BCAT vis-à-vis du PPTO a été effectuée au laboratoire et a montré que la BCAT accepte bien le PPTO en tant que substrat ($K_m = 0,7$ mM et k_{cat} rel = 20 %. Nous avons donc pu préparer la L-PPT à partir du PPTO via une réaction de transamination catalysée par la BCAT d'*E.coli*. Trois systèmes de déplacement d'équilibre ont été testés pour optimiser le rendement de la réaction de transamination.

4.2.6.1 Synthèse de la L-PPT avec un excès de Glu

Dans un premier essai, le Glu a été utilisé comme donneur d'amine en excès (5 eq.) afin de déplacer l'équilibre (**schéma 203**). La quantité de BCAT a été ajustée en tenant compte des paramètres cinétiques pour permettre une réaction complète en quelques heures. Après 15 h de réaction la L-PPT a été isolée après purification sur résines avec un rendement modeste de 34 %.

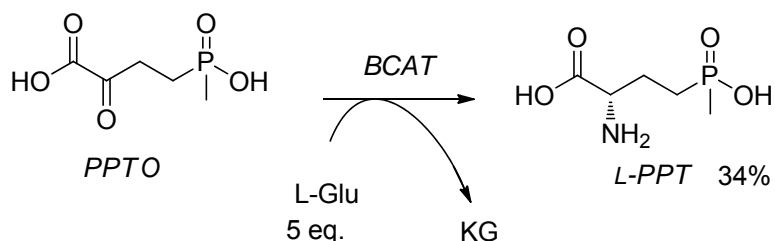


Schéma 203 : synthèse de L-PPT avec un excès du Glu.

Synthèse de La L-PPT en utilisant le couple AspAT-ACS

Dans un deuxième essai, nous avons utilisé le couple AspAT-ACS pour régénérer le Glu utilisé en quantité catalytique (0,2 eq.) (**schéma 204**). Après agitation à température ambiante pendant une nuit, et purification sur résines comme dans le cas précédent, la L-PPT a encore été isolée avec un rendement de 33 %. Dans ce cas, le faible rendement peut s'expliquer par l'inhibition de la BCAT par le SO₂ formé à partir de l'ACS.

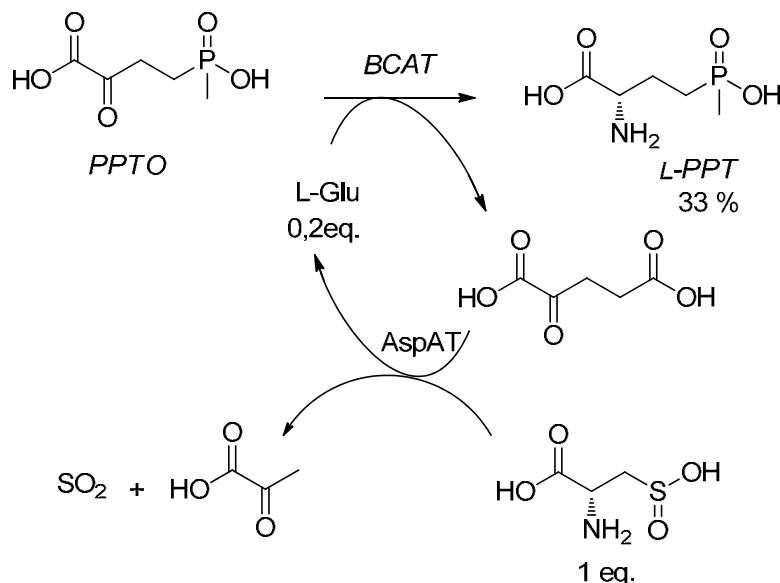


Schéma 204 : synthèse de la L-PPT en utilisant le système AspAT/ACS.

4.2.6.3 Synthèse de L-PPT en utilisant les enzymes GluDH et FDH

Nous avons enfin effectué une troisième synthèse en utilisant le Glu comme donneur d'amine en quantité catalytique (0,2 eq.) et en le régénérant en présence de NADH et NH₃ par une réaction d'amination réductrice catalysée par la GluDH. Le NADH est lui-même utilisé en quantité catalytique et est régénéré de façon irréversible grâce au couple formate-FDH. Après agitation à température ambiante pendant 24 h, et purification sur résines la L-PPT a été isolée avec un rendement de 64 % et avec une excellente pureté.

D'après les trois essais effectués, il est clair que la méthode utilisant les enzymes auxiliaires GluDH et FDH pour régénérer le Glu est la mieux adaptée pour la synthèse de la L-PPT. Nous avons par la suite choisi cette méthode pour la préparation de la L-PPT marquée au deutérium. Il est à noter que ce système a aussi été utilisé au laboratoire pour préparer la ¹⁵N-L-PPT en utilisant du ¹⁵N-Glu et des ions ¹⁵NH₄⁺.

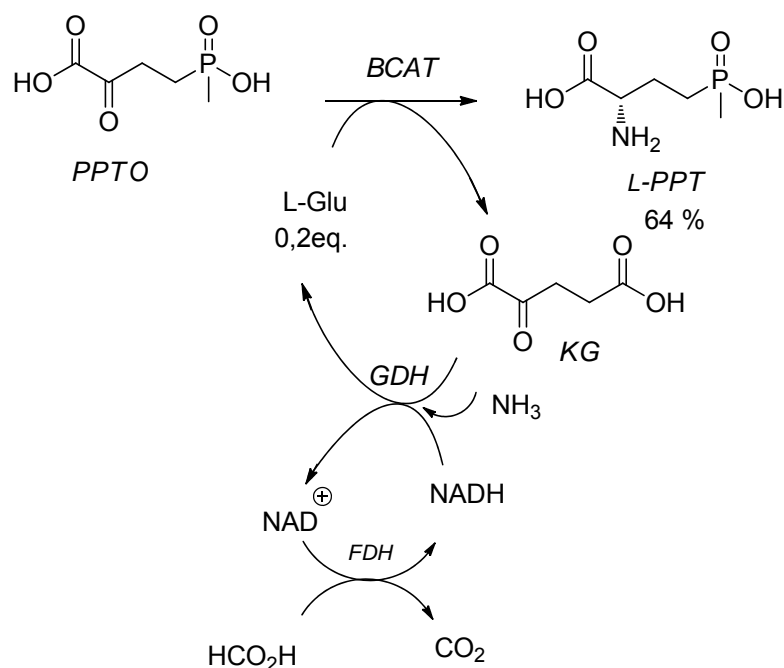


Schéma 205 : synthèse de la L-PPT en utilisant les systèmes GluDH et FDH.

4.2.7 Synthèse de la L-PPT marquée au deutérium

Une de nos tâches a été la préparation de la L-PPT marquée au deutérium dans le but de mettre au point un protocole qui serait applicable pour la synthèse de la L-PPT marquée au tritium. Afin d'accéder à la ^2H -L-PPT, un marquage total au deutérium du PPTO a été effectué avant la réaction de transamination catalysée par la BCAT.

4.2.7.1 Marquage au deutérium du PPTO

L'échange isotopique de tous les atomes d'hydrogènes a été obtenu en incubant le PPTO dans une solution de LiOH dans D_2O à $\text{pH} = 11$ (schéma 206). Une analyse par RMN ^1H a montré la disparition complète des signaux à 2,18-2,95 correspondant aux CH_2 du PPTO.

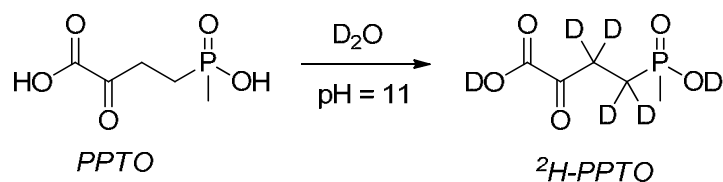


Schéma 206 : marquage du PPTO au deutérium.

4.2.7.2 Synthèse de la ^2H -L-PPT dans H_2O

La réaction de transamination a été effectuée dans H_2O selon le protocole décrit précédemment en utilisant le PPTO marqué au deutérium. La transamination réalisée à $\text{pH} = 7$

a permis de conserver et de stabiliser le marquage en position 3 de la L-PPT qui a été isolée avec un rendement global de 52 % à partir du PPTO non marqué (**schéma 207**). L'analyse par RMN ^1H et ^{13}C montre bien la disparition totale des hydrogènes en position 3 mais aussi la réapparition des signaux correspondant au méthylène en α du groupement phosphoryle (**figure 62**). En effet, le marquage sur cette position est instable et on observe un échange deutérium - hydrogène en solution dans H_2O notamment pendant la purification sur résine de la L-PPT et en particulier lors de l'élution à l'ammoniaque 1M.

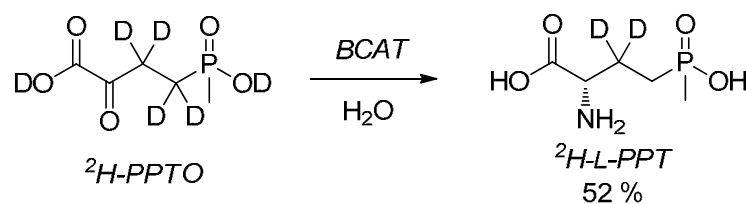


Schéma 207 : préparation de la ^2H -L-PPT par transamination dans H_2O .

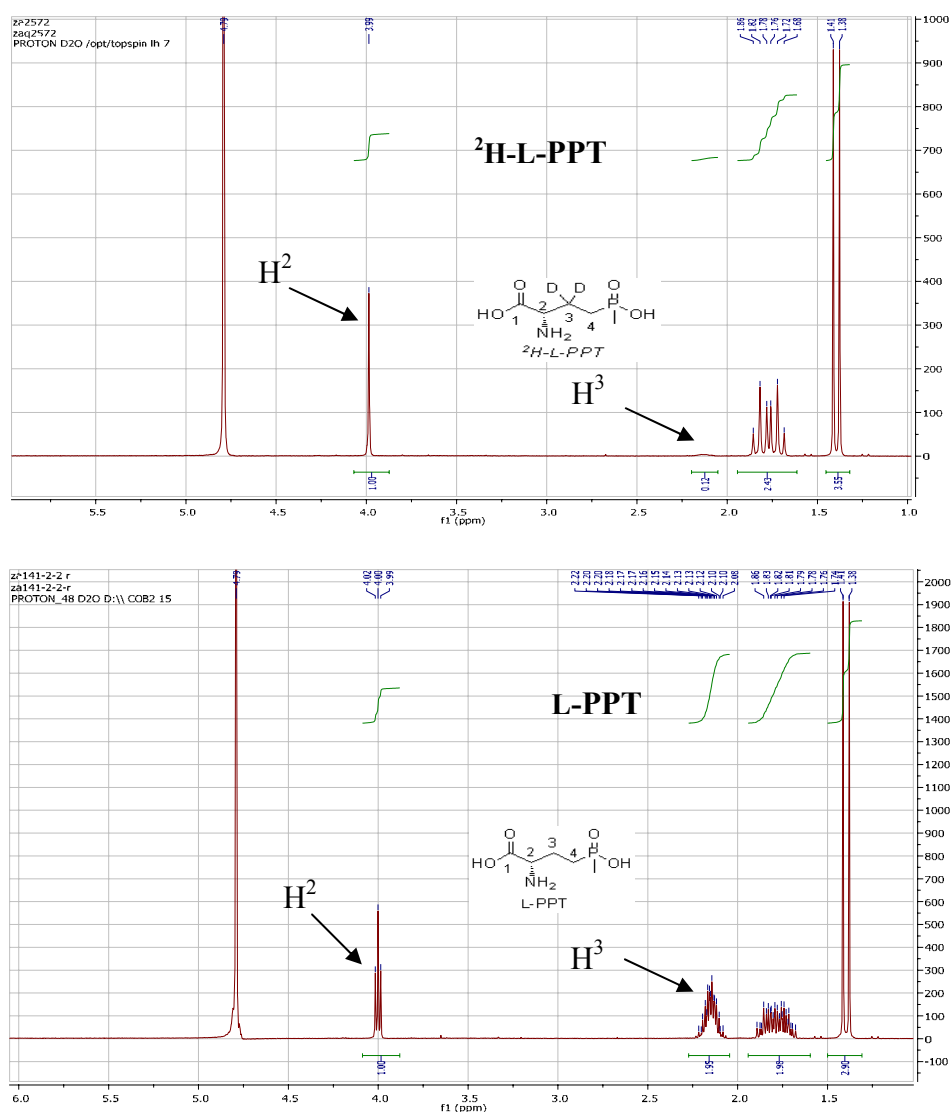


Figure 62 : spectres RMN ^1H de la L-PPT et de la ^2H -L-PPT après la transamination dans H_2O

4.2.7.3 Synthèse de la ^2H -L-PPT dans D_2O

La même stratégie a été mise en œuvre en effectuant la transamination dans D_2O . Ici encore la ^2H -L-PPT a été isolée avec un rendement de 52 % après purification sur résines (schéma 208). L'analyse par RMN ^1H et ^{13}C montre dans ce cas, la disparition du singulet à 3,98 qui correspond au CH en position α (figure 63).

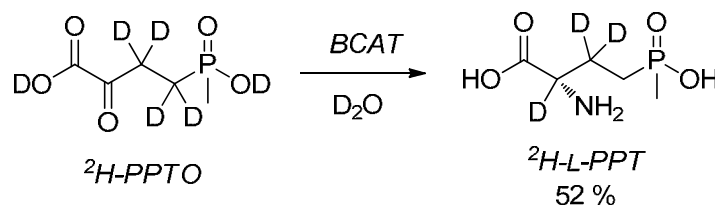


Schéma 208 : préparation de la ^2H -L-PPT par transamination dans D_2O .

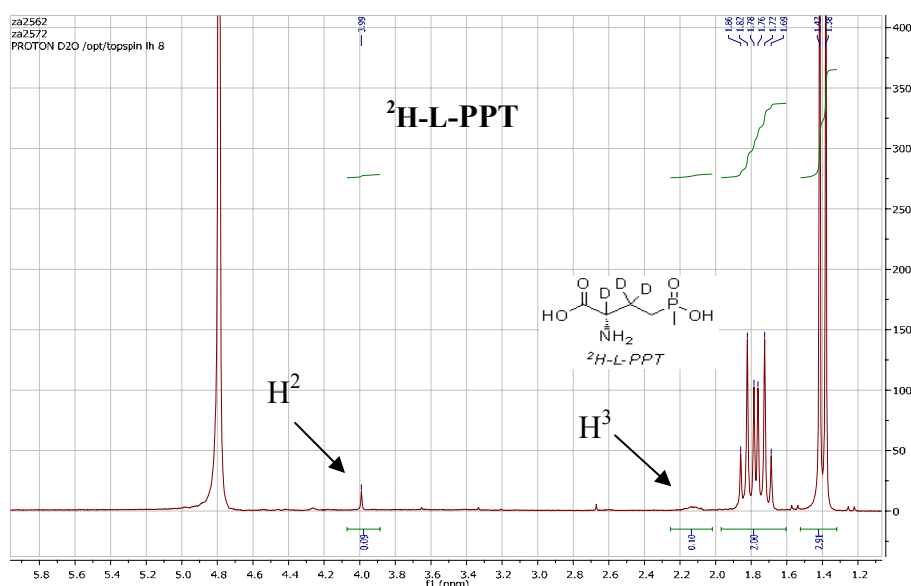


Figure 63 : spectre RMN ^1H de la ^2H -L-PPT après la transamination dans D_2O .

L'incorporation de deutérium sur la position α a lieu lors de la reprotonation de l'intermédiaire quinonoïde formé par réaction entre le PPTO et la pyridoxamine (PMP).

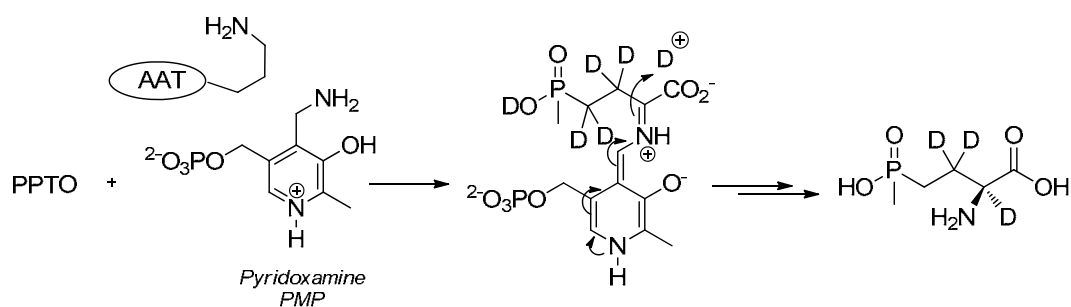


Schéma 209: incorporation de deutérium sur la position α .

Les deux essais ont donc permis de préparer efficacement la ^2H -L-PPT et le protocole mis au point pourrait être appliqué pour effectuer un marquage au tritium .

4.2.8 Synthèse de la D-PPT

Comme nous l'avons déjà évoqué la PPT est disponible commercialement uniquement sous sa forme racémique, mais seule la forme L est active en tant qu'herbicide. La préparation de la D-PPT a été mise en œuvre afin de savoir si elle participe aux effets neurotoxiques de la PPT racémique.

Pour la préparation de la D-PPT nous avons utilisé une D-aminotransférase (qui était disponible commercialement chez Codexis sous la référence AT103). Bien qu'aucune information ne soit donnée par le fournisseur, les D-ATs sont, en général des enzymes à large spectre de substrats. Nous avons mesuré l'activité spécifique de cette enzyme en présence de D-Ala et de KG comme cela apparaît dans le schéma 210.

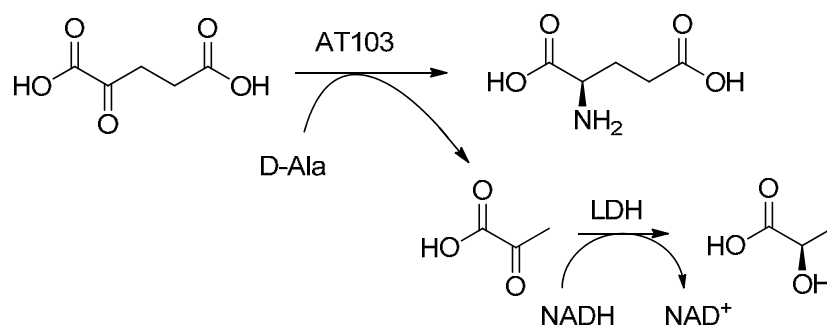


Schéma 210: dosage d'activité de AT103 en présence de D-ala et de KG.

Une activité de 12,5 UI/mg a pu être déterminée. Nous n'avons pas mesuré précisément les paramètres cinétiques relatifs au PPTO mais simplement effectué 2 essais de synthèse de la D-PPT en utilisant la D-Ala ou le D-Glu comme substrat donneur d'amine.

4.2.8.1 Utilisation du D-Glu comme donneur d'amine

Dans cet essai nous avons utilisé le D-Glu en quantité stoechiométrique et les enzymes auxiliaires GluDH et FDH pour déplacer l'équilibre de la réaction de transamination. Après 24 h de réaction, la D-PPT a été obtenue avec un rendement de 43 % et un excès énantiomérique supérieur à 99 %. La détermination de l'excès énantiomérique a été effectuée par HPLC en utilisant la colonne CrownpacK CR+. La figure 64 présente les chromatogrammes obtenus pour la PPT racémique et la D-PPT.

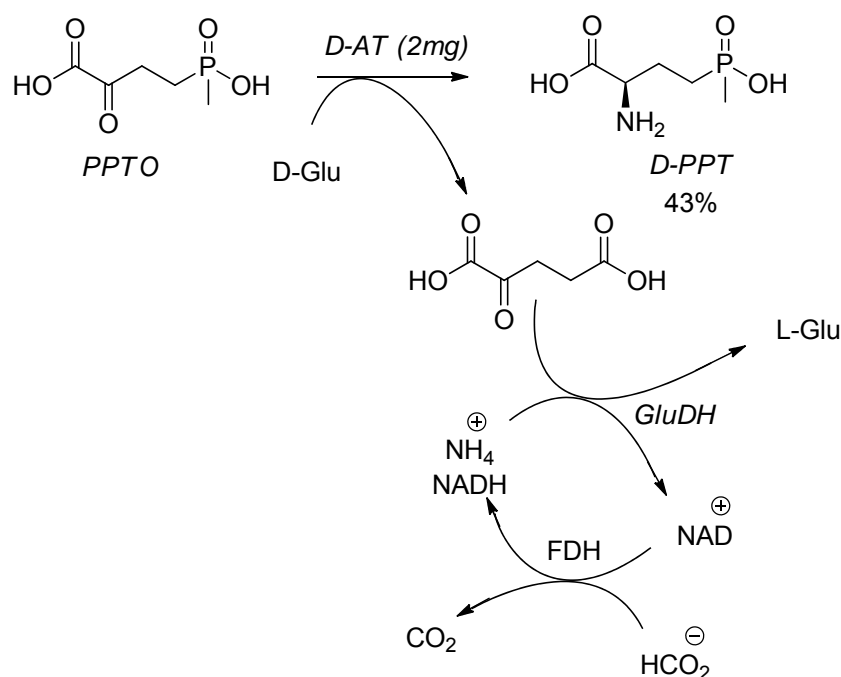
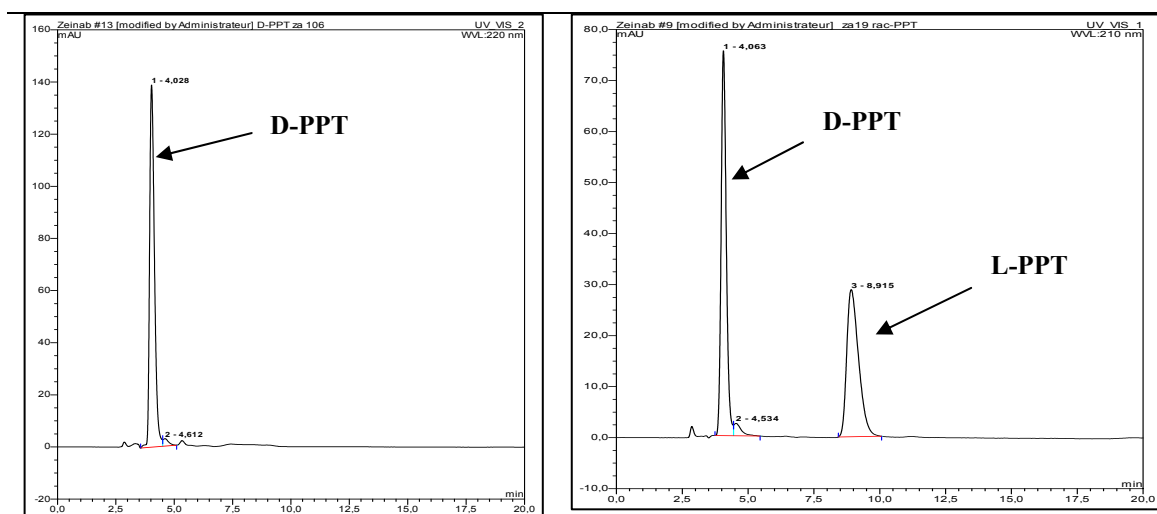


Schéma 211 : synthèse de la D-PPT en utilisant le D-Glu comme donneur.

Chromatogramme obtenu pour la D-PPT

Chromatogramme obtenu pour la rac-PPT



Colonne: CrownpacK CR+, débit = 0,400 ml/min, éluant : HClO₄ 1M, T = 4°C

Figure 64 : chromatogrammes obtenus pour la D-PPT et la rac-PPT.

4.2.8.2 Utilisation de la D-Ala comme donneur d'amine

Nous avons testé un autre protocole utilisant la D-Ala comme substrat donneur d'ammonium et dans lequel l'équilibre est déplacé par la réduction du pyruvate en lactate en présence de la lactate déshydrogénase (LDH) et de NADH, lui-même régénéré comme précédemment. La D-PPT a été obtenue dans ce cas avec un rendement de 36 % et un ee > 99 %.

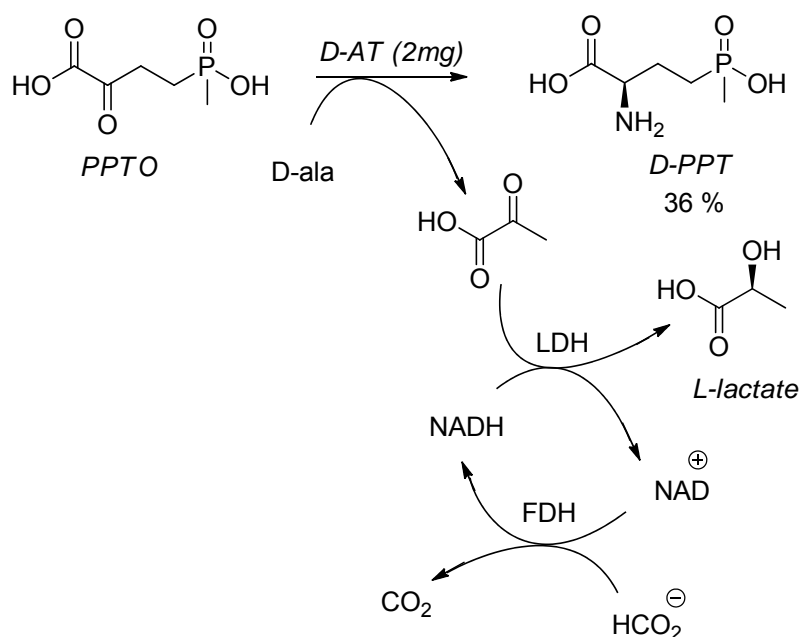


Schéma 212 : synthèse de la D-PPT en utilisant la D-Ala comme substrat donneur d'amine.

Les deux essais ont donc bien permis la préparation de la D-PPT. Le faible rendement obtenu dans les 2 cas, pourrait sans doute être amélioré en augmentant la quantité de D-AT.

4.2.9 Préparation des D et L-PPT par dédoublement cinétique avec la pénicilline acylase

Parallèlement aux méthodes décrites ci-dessus utilisant des aminotransférases, nous avons envisagé un dédoublement cinétique à partir de la D,L-PPT qui pourrait permettre d'accéder aux deux énantiomères (**schéma 213**).

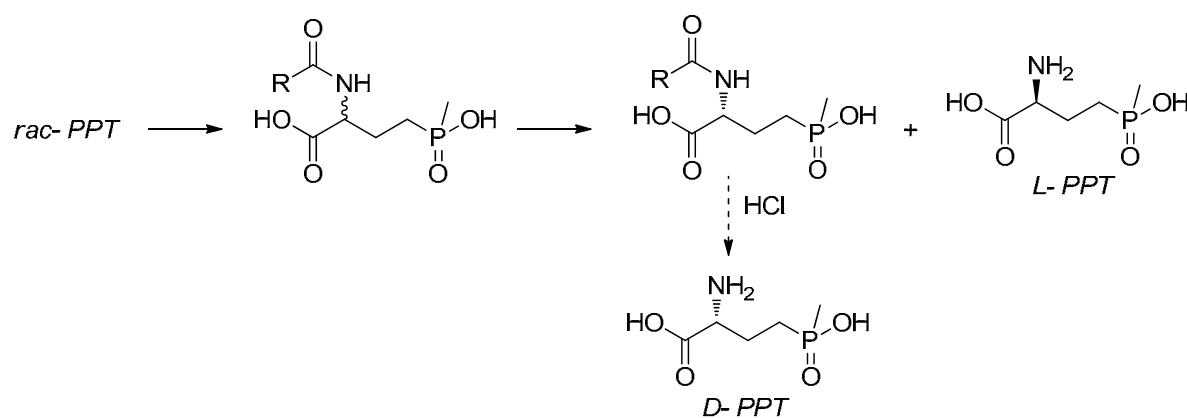
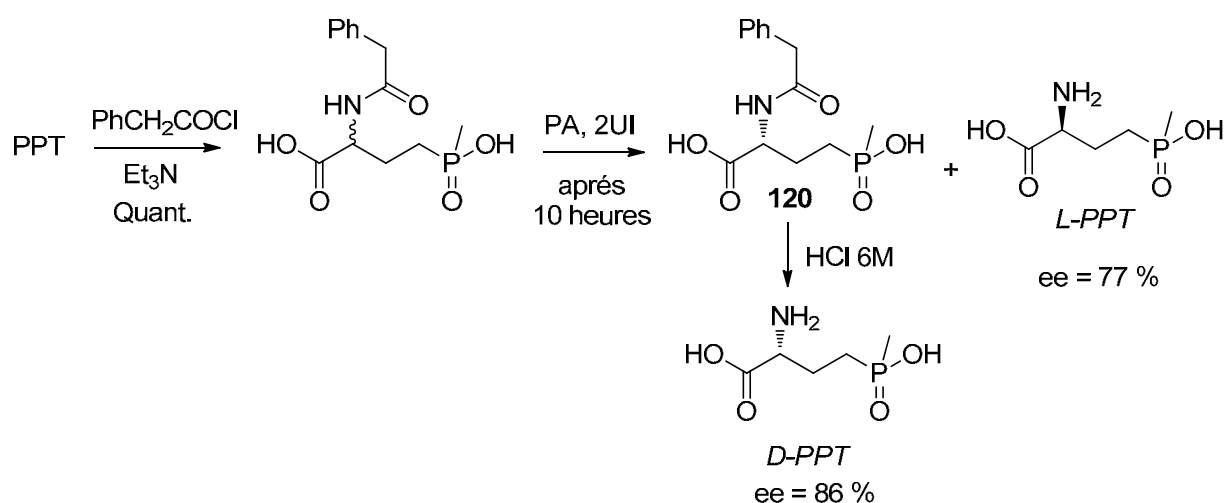
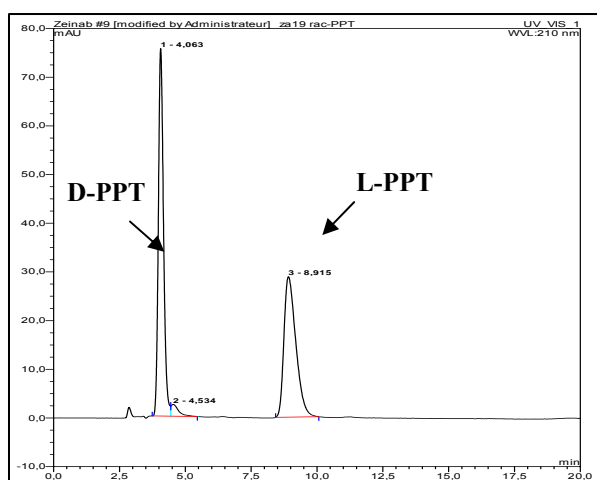


Schéma 213 : synthèse des D et L-PPT par dédoublement cinétique.

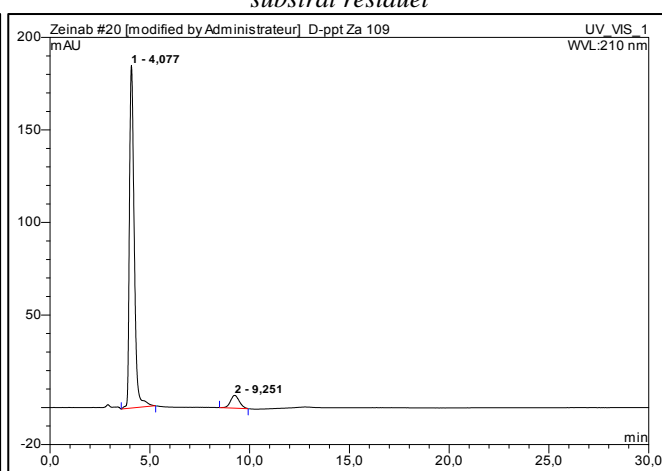
Pour atteindre ce but, nous avons reproduit le dédoublement cinétique de la N-phénylacétyl-PPT (D,L-PAPPT) avec la pénicilline acylase (PA) décrit dans la littérature.²⁷⁷ La PAPPT a été préparée aisément en présence du chlorure de 2-phénylacétyle et de Et₃N avec un rendement quantitatif. Un seul essai de dédoublement a été réalisé sur une quantité de 400 mg avec 2UI de PA (**schéma 214**). Après suivi par CCM, la réaction a été arrêtée après 10 heures. La L-PPT a été purifiée et isolée avec un rendement de 51 % et un excès énantiomérique de 77 % (**figure 65**). Le substrat résiduel **120** a été hydrolysé en présence de HCl 6N. Après purification, nous avons obtenu la D-PPT avec un rendement global de 40 % et un excès énantiomérique de 86 % (**figure 65**).



Chromatogramme obtenu pour la L-PPT



Chromatogramme obtenu pour la D-PPT après hydrolyse du substrat résiduel



Colonne: CrownpacK CR+, débit = 0,400 ml/min,
éluant : HClO₄ 1M, T = 4°C

Figure 65 : chromatogrammes obtenus pour la L-PPT et la D-PPT, produits par dédoublement cinétique avec la PA.

²⁷⁷ S. Grabley **1983**, *US Patent* 4389488.

Les valeurs d'excès énantiomériques nous ont permis, via l'utilisation du logiciel selectivity (développé par l'université de GRAZ), de déterminer un coefficient d'énantiosélectivité $E = 20$ (**figure 66**). Cette valeur est relativement faible pour effectuer un dédoublement cinétique dans de bonnes conditions. Comme cela apparaît dans la figure 66 l'obtention de la D-PPT avec un très bon excès énantiomérique ($> 98\%$) nécessite un taux de conversion de 70% et conduira à un rendement n'excédant pas 30% . La L-PPT quant à elle ne peut pas être obtenue optiquement pure via ce procédé.

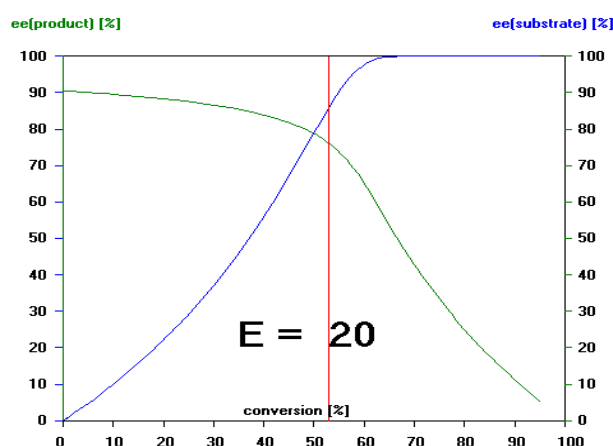


Figure 66 : évolution des excès énantiomériques du substrat (PAPPT) et du produit (L-PPT) en fonction du taux de conversion.

Chapitre V Evaluation biologique des métabolites de la PPT

Certaines des molécules que nous avons préparées ont fait l'objet d'études pour déterminer leur action épileptogène, ainsi que leur activité vis-à-vis de la GS (*in vitro* et *in vivo*). Ces études ont été effectuées dans l'équipe du Pr. J. Pichon de l'Université d'Orléans.

5.1 Etudes électroencéphalographiques

Après injection des métabolites (PPTO, PPTOH, MPPA et MPAA) par voie intrapéritonéale chez des souris à une dose de 75 mg/kg, les activités électroencéphalographiques (enregistrement des ondes électriques cérébrales) ont été enregistrées. La PPT et la NAPPT ont été injectées à la même concentration afin de comparer leur activité à celle des métabolites. La NAPPT utilisée a été préparée précédemment au laboratoire par le Pr. Thierry Gefflaut.

Parmi les métabolites, seul le PPTO a induit des crises d'épilepsie avec un délai plus court (1h30 plus tôt que la PPT pour laquelle le délai d'apparition de la crise est de 4h30) et une intensité plus grande que la PPT, que ce soit au niveau comportemental ou électroencéphalique.

5.2 Action des métabolites sur l'activité de la GS cérébrale

5.2.1 Dosage de l'activité GS d'extraits cérébraux *in vitro*

Les différents métabolites (NAPPT, PPTO, PPTOH, MPPA et MPAA) et la PPT ont été ajoutés à une concentration de 1 mM à des homogénats de cortex, hippocampe et cervelet. Le dosage d'activité de la GS a été réalisé par colorimétrie en remplaçant l'ammoniac par l'hydroxylamine :



Schéma 215 : principe de dosage de la GS.

Le γ -Glutamyl hydroxamate formé est révélé par addition de chlorure ferrique à pH acide. La coloration brune obtenue correspond à un maximum d'absorbance à 535 nm et l'activité GS d'un échantillon est donc estimée par la concentration de complexe formé en 1h.

La figure ci-dessous représente les résultats obtenus avec les différents métabolites, les résultats sont présentés sous forme de pourcentage d'activité par rapport au témoin sans ajout de PPT ou de ses dérivés. La PPT, comme attendu, a un effet inhibiteur sur la GS de tous les

tissus cérébraux testés. Les effets obtenus avec les autres métabolites semblent plus variés selon les tissus. Les résultats avec l'hippocampe apparaissent les plus homogènes avec une inhibition généralisée de tous les métabolites du niveau de celle de la PPT.

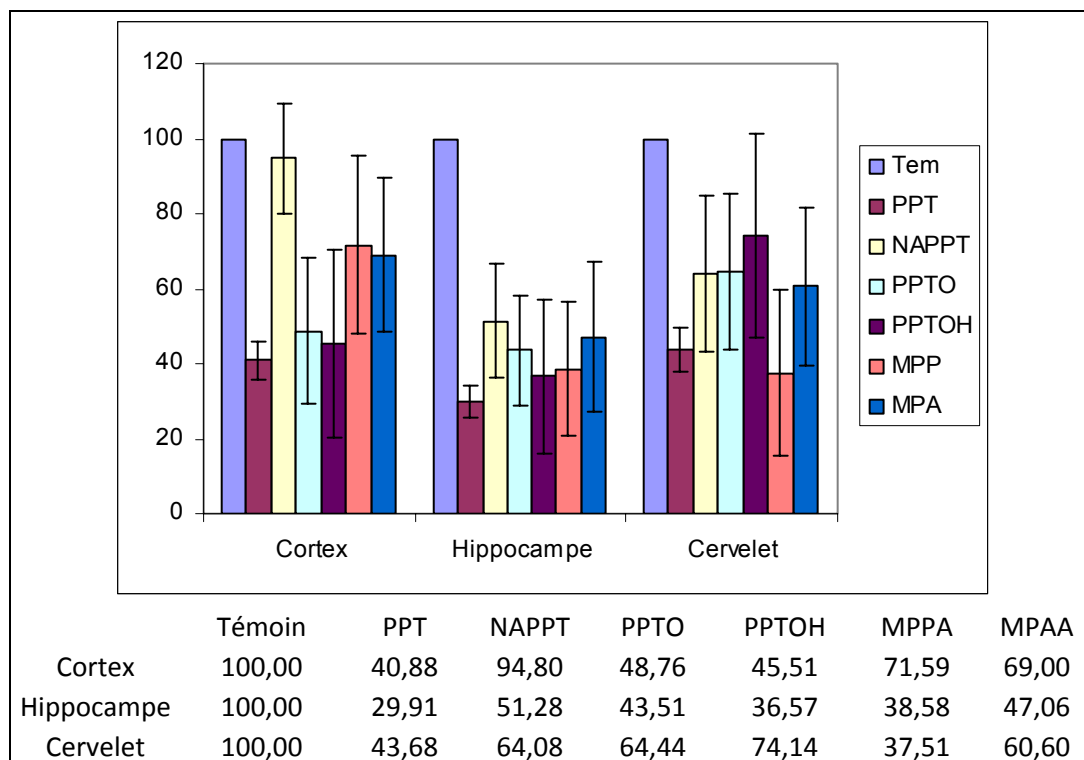


Figure 67 : action *in vitro* de la PPT et de ses métabolites sur la GS d'extraits cérébraux.

5.2.2 Inhibition *in vitro* de la GS de mouton purifiée

Le but de cette expérience est de tester l'action directe des métabolites sur l'activité de la GS. Dans ce but, la GS de mouton purifiée (Sigma, G-6632) a été utilisée avec des concentrations de 1 et 10 mM de PPT et des différents métabolites. Les résultats sont présentés à la figure 68. A une concentration de 1 mM, la PPT présente l'action inhibitrice la plus importante. Parmi les métabolites, seul le MPPA montre une inhibition nette à 1 mM. La PPT et la plupart des métabolites ont une action inhibitrice pouvant aller jusqu'à une inhibition totale à 10 mM. Seul le PPTO semble ne pas avoir un effet inhibiteur significatif même à 10 mM.

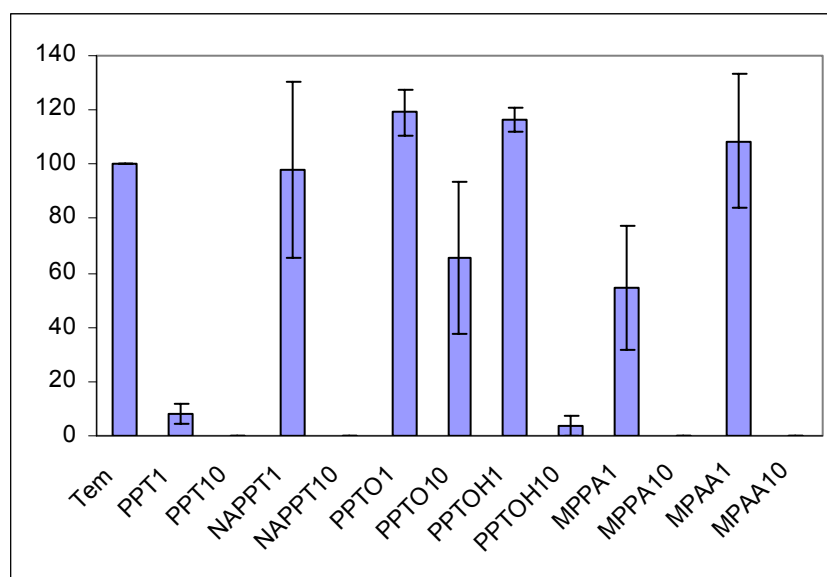


Figure 68 : action *in vitro* de la PPT et de ses métabolites sur la GS purifiée de mouton.

5.2.3 Dosage de l'activité de la GS d'extrait cérébraux *in vivo*

Des souris traitées avec de la PPT, NAPPT, PPTO et PPTOH, à 75 mg/kg ont été sacrifiées 24h après l'injection initiale. L'activité de la GS (**figure 69**) de tous les tissus testés (cortex, hippocampe et cervelet) a été déterminée comme précédemment.

Une augmentation de l'activité GS est observée 24h après administration de PPT, au niveau du cortex et de l'hippocampe. Quelle que soit la structure étudiée, la NAPPT n'a pas d'effet significatif sur l'activité GS. Le PPTO, quant à lui, provoque une augmentation de l'activité GS dans des proportions plus importantes que la PPT dans le cortex et l'hippocampe. Concernant le PPTOH, une activation de la GS a aussi été observée. Cependant, les tests n'ont été réalisés que sur 2 souris et des études restent à faire pour confirmer ce résultat.

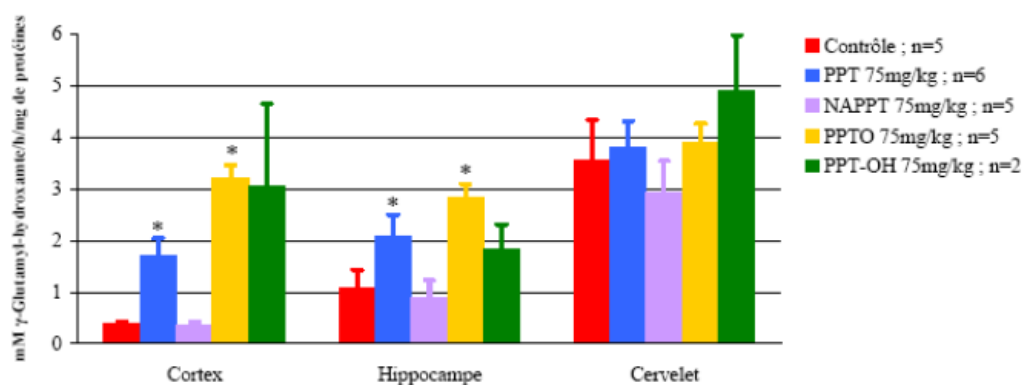


Figure 69 : action *in vivo* de la PPT et de ses métabolites sur l'activité GS.

Dans le cas du MPPA, comme le montre la figure 70, l'activité a été mesurée après 4h, 7h et 24h, après l'injection du métabolite. Une inhibition importante de la GS a été remarquée après 4h dans l'hippocampe, tandis qu'elle apparaît plus tardivement dans le cortex. Ces effets d'inhibition ont disparu 24 heures après l'injection. Aucun effet notable n'a été constaté dans le cervelet.

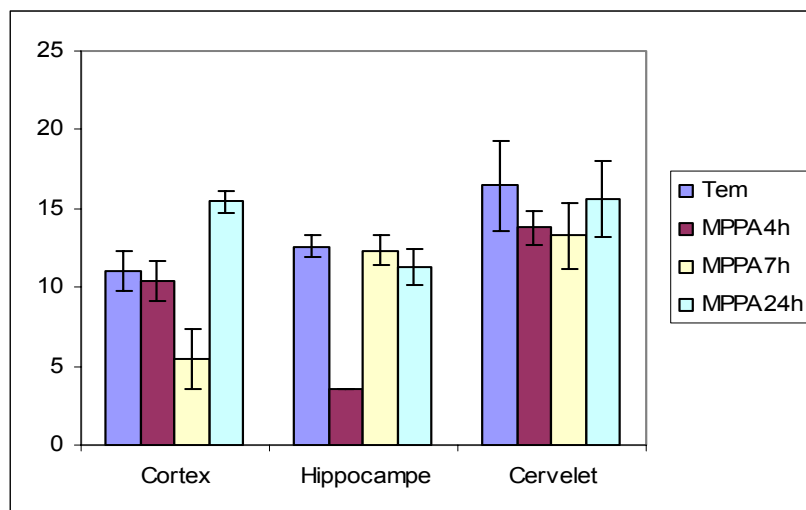


Figure 70 : action *in vivo* du MPPA sur l'activité GS

Comme dans le cas précédent, l'activité du MPAA a été mesurée 4h, 7h et 24h, après l'injection du métabolite. Comme pour le MPPA, un effet inhibiteur de la GS a été observé dans l'hippocampe. Par contre, le MPAA maintient son effet 7h après l'injection et son effet semble s'étendre aux autres tissus (**figure 71**).

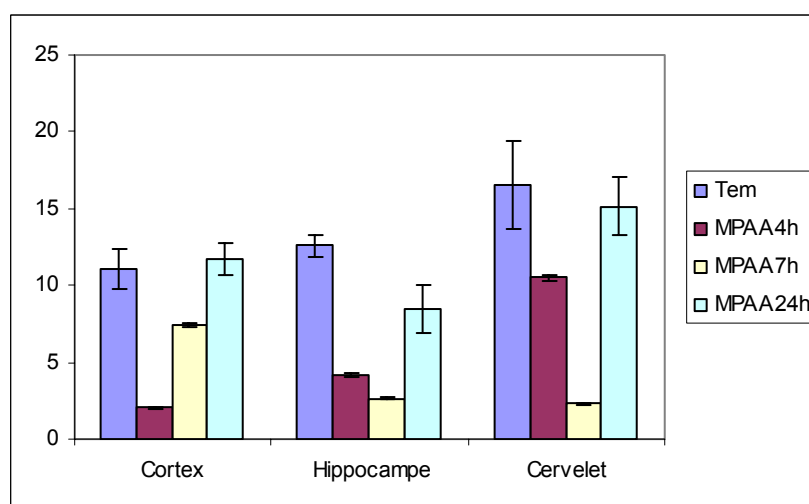


Figure 71 : action *in vivo* du MPAA sur l'activité GS.

5.3 Interprétation des résultats

Comme cela avait été décrit précédemment, la PPT déclenche bien une crise épileptique et une augmentation de l'activité GS *in vivo* a été observée. Parmi les métabolites seul le PPTO a déclenché une crise d'épilepsie caractérisé par un délai plus court entre l'injection et le déclenchement de la crise. Ceci peut laisser penser que le PPTO est le métabolite neuroactif de la PPT qui provoque la crise d'épilepsie. On peut aussi penser que le PPTO est mieux transporté que la PPT dans le SNC et que les aminotransférases qui se trouvent dans les différents tissus testé (et en particulier la BCAT) sont responsables de la transformation du PPTO en PPT. Le résultat du dosage *in vitro* effectué sur la GS purifiée de mouton semble compatible avec cette hypothèse (faible inhibition même à 10 mM). Comme la PPT, le PPTO n'inhibe pas la GS *in vivo*, mais il augmente son activité, ceci pourrait être la conséquence de la crise d'épilepsie produisant une activation des astrocytes et des cellules microgliales qui expriment la GS.²⁷⁸ Dans le cas du MPPA et du MPAA, une inhibition de la GS a été observée avec un impact similaire *in vitro* et *in vivo*. Compte tenu de leur activité *in vivo*, on peut supposer qu'ils atteignent le SNC. Par ailleurs, étant donné qu'ils n'ont pas d'activité épileptogène, on peut supposer que l'inhibition de la GS n'est pas l'élément principal de l'activité épileptogène.

Il semble donc difficile d'établir un lien entre les modifications d'activité GS et la genèse des crises épileptiques induite par la PPT et le PPTO. Les résultats obtenus avec les différents métabolites sont intéressants mais de nombreux travaux restent à faire notamment l'étude des deux énantiomères de la PPT. L'utilisation de PPT marquée pourra aussi permettre d'étudier la métabolisation et la biodistribution de la PPT et de ses métabolites.

Notons que l'inhibition de la GS cérébrale par la NAPPT *in vitro* (alors qu'il est établi non inhibiteur de la GS végétale) suggère qu'elle pourrait agir sur l'organisme des animaux et de l'homme qui ingèrent des plantes transgéniques. De plus, même si ces molécules ne semblent pas agir sur la GS cérébrale quand elles sont injectées *in vivo*, elles peuvent agir sur la GS localisée dans d'autres organes tels que le foie. On peut également s'interroger sur les risques d'un clivage de la NAPPT par des désacétylases endogènes des organismes consommateurs de ces OGMs, régénérant ainsi la PPT potentiellement neurotoxique.

²⁷⁸ J. Choi, S. Koh *Yonsei Med. J.* **2008**, 49, 1-18.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nous avons mis au point une méthode générale et efficace basée sur la formation d'un anhydride mixte. Cette méthode en 4 étapes a permis de préparer sans difficulté une série d'analogues du KG fonctionnalisés en position 4 par divers amides, hydroxamates ou hydrazide avec des rendements globaux compris entre 50 et 94 % (**schéma 215**).

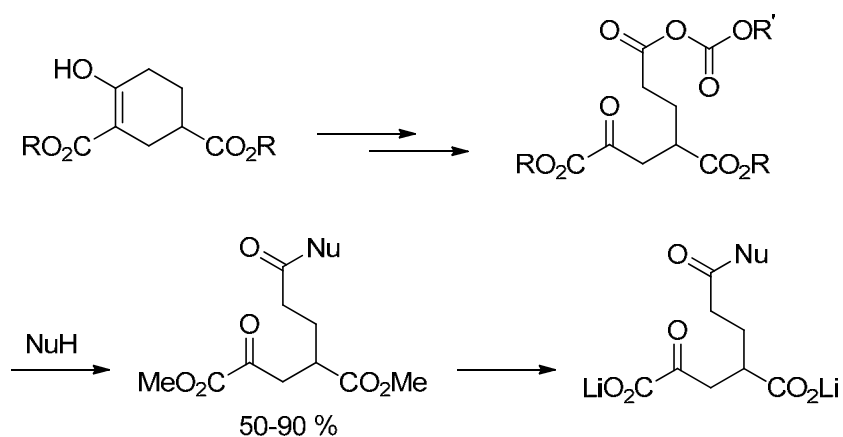


Schéma 215 : méthode générale pour la synthèse des analogues du KG fonctionnalisés.

Cette stratégie offre également la possibilité de préparer des cétoacides disubstitués en position 4 (**schéma 216**).

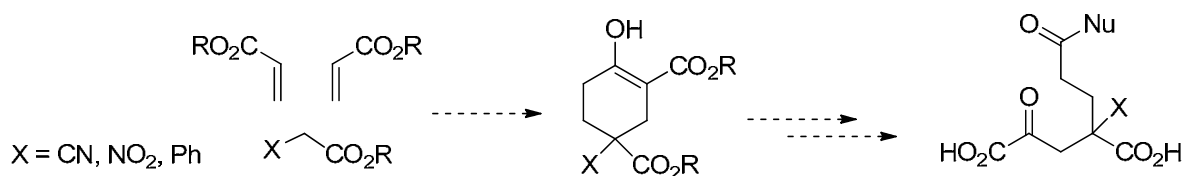
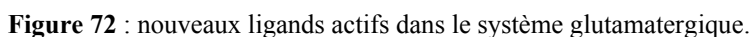


Schéma 216 : perspectives pour la synthèse d'analogues du KG disubstitués en position 4.

Les différents cétoacides obtenus ont pu être efficacement transformés de façon hautement stéréosélective en analogues du Glu avec l'AspAT d'*E.coli*. 20 nouveaux analogues du Glu ont été ainsi préparés, qui font actuellement l'objet d'études



Notre approche synthétique nous a également permis de préparer deux analogues du Glu précurseurs potentiels de nouveaux dérivés. Cette approche pourrait permettre de s'affranchir de la spécificité de substrats des ATs. En effet, les deux composés **103** et **105** pourraient permettre de préparer plusieurs séries d'analogues après la protection de la fonction amine en α (**schéma 217**).

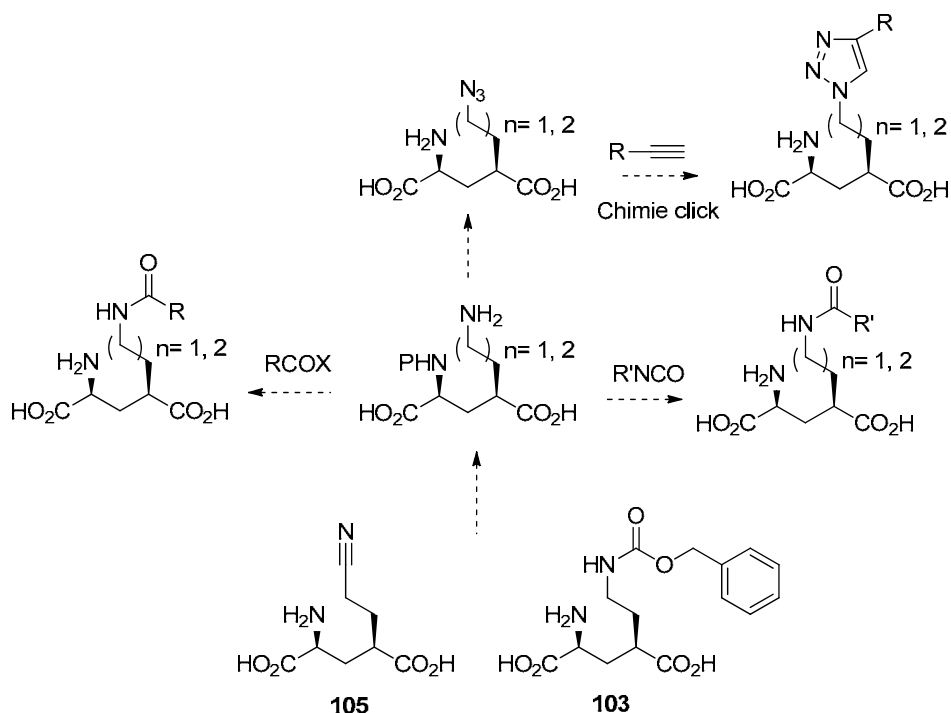


Schéma 217: perspectives à partir des diamines **103** et **105**.

Nous avons également pu préparer l'azépane **107**, qui a été obtenu comme produit secondaire lors de la réduction du nitrile **105**, si l'évaluation pharmacologique de ce dérivé donne des résultats intéressants on pourrait alors envisager la synthèse d'une série de dérivés azépane. Ces produits pourraient, par exemple, être préparés à partir d'une diazocétone, selon l'enchaînement réactionnel décrit dans le schéma 218.

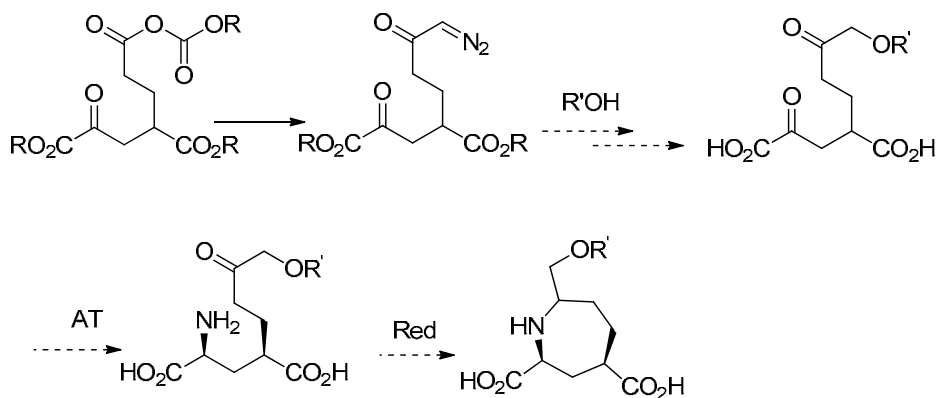


Schéma 218: perspective pour la synthèse de dérivés azépane.

Le composé nitrile **105** peut également servir pour la préparation de plusieurs autres dérivés. En effet, ce nitrile peut être converti en aldéhyde et permettre la synthèse d'une série d'oximes. L'aldéhyde peut aussi donner accès à l'azépane.

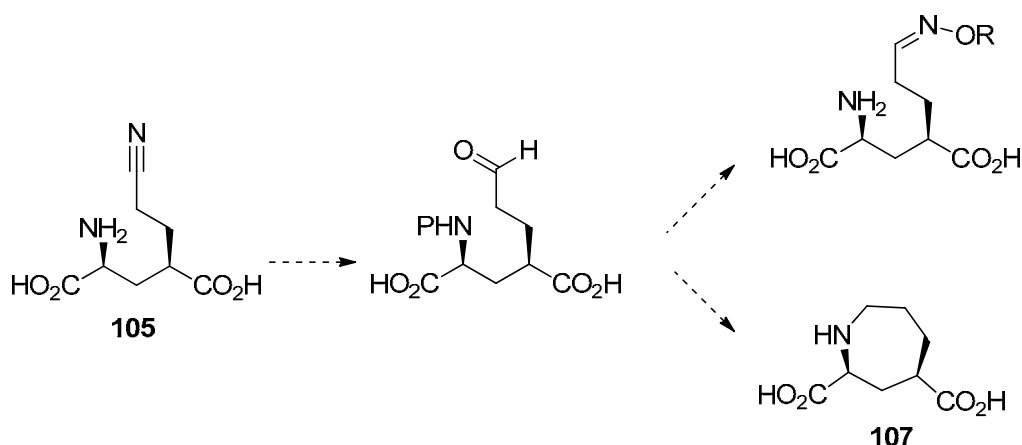


Schéma 220: perspectives à partir du nitrile 105.

Dans le cadre du projet Herbitox, nous avons pu préparer la PPT sous ses formes énantiopures D et L ainsi que ses différents métabolites : PPTO, PPTOH, MPPA et MPAA. Ces métabolites ont fait l'objet de premières études pour déterminer s'ils possèdent une action épileptogène. Leur activité vis-à-vis de la glutamine synthétase (GS) a aussi été étudiée. Un résultat important a été obtenu avec le PPTO qui a provoqué une crise d'épilepsie plus rapidement et plus intense que la PPT après une injection intrapéritoneale. Bien que des études complémentaires soient nécessaires, il est possible que le cétoacide atteigne plus facilement le SNC que la PPT et qu'il soit convertit en PPT par des ATs. Si ce mécanisme est confirmé, il permettra de conforter notre stratégie de synthèse chimioenzymatique en conférant aux céto-glutarates que nous préparons un caractère de prodrogue potentielle. Nous avons pu également préparer de la ^2H -L-PPT. Le protocole mis au point pourrait être utile pour la préparation de la L-PPT marquée au tritium. Il est intéressant de noter que ce procédé de marquage apparaît général et pourra être appliqué dans le futur à la préparation d'autres analogues du Glu radiomarqués.

PARTIE EXPERIMENTALE

GENERALITES

Les produits commerciaux sont utilisés sans purification préalable. Les solvants anhydres utilisés sont séchés et distillés selon les procédures usuelles (toluène et Et₂O sur Na, MeOH sur Mg/I₂, CH₂Cl₂ sur CaH₂, Pyridine sur KOH...)

Les chromatographies sur couches minces sont effectuées sur gel de silice (Merk, support aluminium, 60F254). Le solvant d'élution varie suivant les produits. Les plaques sont révélées par exposition sous U.V, puis trempage dans une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10% contenant 1% de vanilline suivi d'un chauffage, ou par trempage dans une solution de KMnO₄ dans l'eau suivi d'un chauffage. La ninhydrine (solution à 2 % dans EtOH) a été utilisée pour révéler les composés aminés.

Les chromatographies sur colonnes sont effectuées avec de la silice MN Kieselgel 60 M (0,04-0,063 mm/ 230-400 mesh, Macherey-Nagel).

Les chromatographies sur résine ont été effectuées dans des colonnes ouvert (Dowex 50 et Dowex 1) ou en colonne fermé en utilisant un système de chromatographie FPLC (pharmacia) (résine QAE Séphadex).

La résine Dowex 1 (initialement sous forme Cl⁻) est équilibrée sous la forme AcO⁻ de la façon suivante : un volume de résine est mis en place dans la colonne, élué avec 10 volumes d'une solution aqueuse de NaOH 1M, puis avec H₂O jusqu'à neutralité du percolat puis avec une solution aqueuse d'AcOH 1 M jusqu'à acidité du percolat et enfin avec H₂O jusqu'à neutralité.

La résine Dowex 1 est équilibrée sous la forme HCO₃⁻ de la façon suivante : un volume de résine sous la forme AcO⁻ est mis en place dans la colonne, élue avec 10 volumes d'une solution de bicarbonate d'ammonium 1M puis avec H₂O jusqu'à neutralité du percolat.

La résine basique QAE Séphadex est équilibrée sous la forme HCO₃⁻ avec 10 volumes d'une solution de bicarbonate d'ammonium 1M puis rinçage avec H₂O jusqu'à neutralité.

Les ozonolyses sont effectuées avec un ozoneur Fischer modèle 502 en utilisant de l'oxygène anhydre. Le diazométhane a été préparé en utilisant de la verrerie sans rodage (mini kit Aldrich).

Les spectres de RMN sont enregistrés sur un appareil Bruker Avance-400 (¹H : 400 MHz ; ¹³C : 100 MHz). Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par référence au tétraméthylsilane. Les abréviations utilisées sont : m multiplet ; s singulet ; d doublet ; t triplets ; dd doublet dédoublé ; ddd doublet dédoublé dédoublé ; q quadruplet ; quint ; quintuplé....

Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil de type Hewlett packard MS Engine 5989B équipé de 3 modes d'ionisation (Impact électronique, Ionisation chimique, Electrospray).

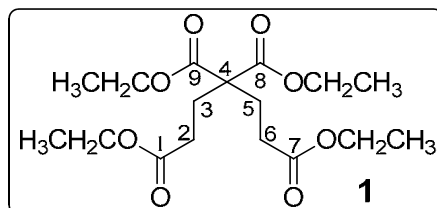
Les spectres IR sont réalisés sur un appareil FT IR Paragon 880 PERKIN ELMER. Pour les produits liquides, on réalise un film entre deux pastilles de KBr. Dans le cas de produits solides, on prépare une pastille de KBr (avec 1% de produit).

Les mesures de pouvoir rotatoire sont effectuées sur un polarimètre Jasco DIP-370, à la longueur d'onde de la raie du sodium (589 nm). Les mesures se font à température constante et les concentrations sont exprimés en g/100 mL.

Les points de fusion sont mesurés à l'aide d'un microscope REICHERT 2849223

Les microanalyses ont été effectuées au service central d'analyse du CNRS à Solaize (69).

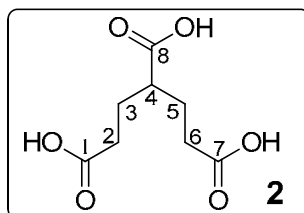
SYNTHESE DES ANALOGUES DU KG

Pentane-1,3,5-(tétracarboxylate) de tétraéthyle **1** ($C_{17}H_{28}O_8$, 360,4 g/mol)

A une solution de malonate d'éthyle (10 mL, 65,9 mmol) dans EtOH (10 mL), on ajoute du Na (110 mg, 4,8 mmol). Après refroidissement du milieu à 0 °C, l'acrylate d'éthyle (21,4 mL, 197,6 mmol) est additionné goutte à goutte. Le milieu est agité à température ambiante toute une nuit. Une solution aqueuse d'HCl 1N (6 mL) est ajoutée jusqu'à obtenir un pH = 4 puis on additionne une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL). La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (35 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ puis concentrées sous pression réduite. L'excès d'acrylate est éliminé sous pression réduite (0,5 mm Hg). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (22,03 g, **97 %**).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,24 (6H, t, $J = 7,2$ Hz, 2 x CH_3), 1,25 (6H, t, $J = 7,2$ Hz, 2 x CH_3), 2,25 (4H, m, H^5 et H^3), 2,33 (4H, m, H^6 et H^2), 4,15 (4H, q, $J = 7,2$ Hz, 2 x OCH_2), 4,24 (4H, q, $J = 7,2$ Hz, 2 x OCH_2).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 2,0 et 14,2 (CH_3), 28,1 (C^5 et C^3), 29,5 (C^6 et C^2), 60,6 et 61,5 (OCH_2), 130,5 (C^4), 170,7 (C^7 et C^1), 172,6 (C^8 et C^9).

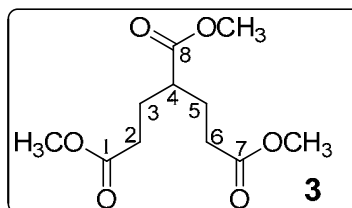
Acide pentane-1, 3, 5-tricarboxylique **2** ($C_8H_{12}O_6$, 204,18 g/mol)

Une suspension du composé **2** (5 g, 13,9 mmol) dans une solution aqueuse de HCl 6N (300 mL) est chauffée à 100 °C pendant 4 jours. Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le résidu solide est repris dans H_2O (100 mL) puis la solution est concentrée sous pression réduite. Le résidu est repris avec du cyclohexane (100 mL) puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Cette opération est répétée 3 fois. Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (2,7 g, **95 %**).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 1,74 (4H, m, H^5 et H^3), 2,32 (4H, m, H^6 et H^2), 2,36 (1H, m, H^4)

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 26,3 (C^5 et C^3), 31,3 (C^2 et C^6), 43,6 (C^4), 177,5 (C^1 et C^7), 179,4 (C^8).

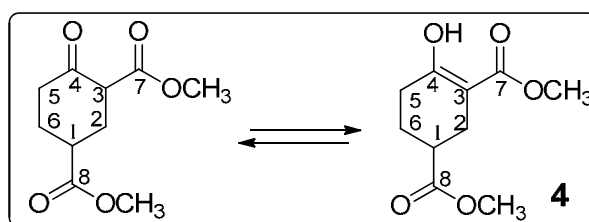
Pf = 114 – 115 °C.

Pentane-1,3,5-tricarboxylate de triméthyle 3 (C₁₁H₁₈O₆, 246,26 g/mol)

A une solution du composé 2 (12,25 g, 60 mmol) dans MeOH (91 mL) est additionné du H₂SO₄ concentré (12 mL). Le mélange est chauffé à 80°C pendant 4 jours. Le milieu est ensuite concentré sous pression réduite puis dilué dans H₂O (150 mL). La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 150 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (150 mL) puis avec H₂O (100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore. (12,87 g, **87%**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,78 (2H, m, H^{3a} et H^{5a}), 1,85 (2H, m, H^{3b} et H^{5b}), 2,27 (4H, m, H² et H⁶), 2,39 (1H, m, H⁴), 3,60 (6H, s, OCH₃), 3,62 (3H, s, OCH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 26,9 (C³ et C⁵), 31,6 (C² et C⁶), 43,8 (C⁴), 51,6 et 51,7 (OCH₃), 173,2 (C¹ et C⁷), 175,2 (C⁸).

4-oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de diméthyle 4 (C₁₀H₁₄O₅, 214,22 g/mol)

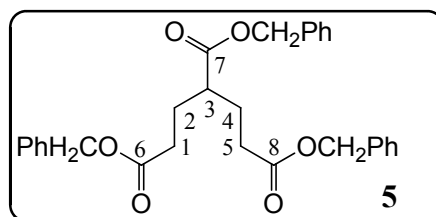
A une solution de composé 3 (13 g, 52,8 mmol) dans le toluène (190 mL) on additionne une solution de MeONa 2 M (95 mL, 190 mmol) fraîchement préparée. Cette solution est préparée au préalable par addition de Na (6,9 g, 0,3 mmol) dans un mélange de MeOH (50 mL, 1,23 mol) et de toluène (100 mL) puis chauffage à 80°C pendant 24 h. Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant une nuit, puis neutralisé avec une solution d'acide acétique concentré, jusqu'à obtenir un pH = 6. On additionne H₂O (100 mL), et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (2 x 160 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt: 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (9,6 g, **85 %**).

Le produit en solution dans CDCl₃ se présente sous sa forme énol.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,78 (1H, m, H^{5a}), 2,10 (1H, m, H^{5b}), 2,39 (3H, m, H⁶ et H^{2a}), 2,58 (2H, m, H^{2b} et H¹), 3,72 (3H, s, OCH₃), 3,78 (3H, s, OCH₃), 12,16 (1H, OH).

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 24,1 (C⁵), 24,8 (C⁶), 28,1 (C²), 39,0 (C¹), 51,5 et 51,8 (OCH₃), 96,1 (C³), 171,1 (C⁴), 172,5 (C⁷), 175,0 (C⁸).

Pentane-1,3,5-tricarboxylate de tribenzyle **5** ($C_{29}H_{30}O_6$, 474,54 g/mol)



A une solution de composé **2** (6 g, 29,4 mmol) dans le DMF anhydre (30 mL), sont additionnés du K_2CO_3 (10 g, 72,35 mmol) et du bromure de benzyle (13 mL, 109,4 mmol). Le milieu est chauffé à 80°C pendant 48 h. On ajoute H_2O (130 mL) et la phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (2 x 180 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/ $AcOEt$: 9/1 puis 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (11,5 g, **83 %**).

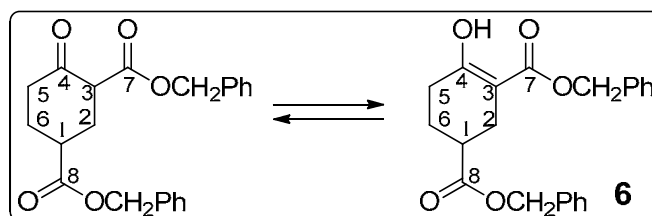
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,87 (2H, m, H^{2a} et H^{4a}), 1,98 (2H, m, H^{2b} et H^{4b}), 2,35 (4H, m, H^1 et H^5), 2,5 (1H, m, H^3), 5,09 (4H, s, 2 x OCH_2), 5,10 (2H, s, OCH_2), 7,33 (15H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 27 (C^2 et C^4), 31,7 (C^1 et C^5), 43,8 (C^3), 66,33 (2 x OCH_2), 66,4 (OCH_2), 128,22, 128,25 et 128,6 (CH^{ar}), 135,9 (C^{ar}), 172,6 (C^6 et C^8), 174,6 (C^7).

IR (film, cm^{-1}) : 3064 et 3033 (C-H ar v), 2951 (C-H alk v), 1736 (C=O ester v), 1454 et 1337 (C-H δ), 1253 et 1160 (C-O ester v), 747 et 698 (C-H ar δ).

SM (ES+) m/z calculé pour $C_{29}H_{30}O_6Na$: 497,1872, exp : 497,1872.

4-oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de dibenzyle **6** ($C_{22}H_{22}O_5$, 366,4 g/mol)



A une solution de composé **5** (7 g, 14,7 mmol) dans le toluène (80 mL) on ajoute une suspension de phénylméthanolate de sodium 1M (44 mL) fraîchement préparée. Cette suspension est préparée au préalable par addition de Na (1,01 g, 44,13 mmol) et $BnOH$ (5,48 mL, 52,98 mmol) dans le toluène (60 mL) puis chauffage à 80 °C pendant une nuit. Le milieu réactionnel est chauffé à 80 °C pendant 3 h puis neutralisé par addition d'une solution d' $AcOH$ 2M préparée dans le toluène (25 mL). On additionne H_2O (70 mL). La phase aqueuse est extraite avec $AcOEt$ (1 x 60 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ et concentrées sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane /acétate d'éthyle : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaunâtre (3,6 g, **67 %**).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,73 (1H, m, H^{5a}), 1,97 (1H, m, H^{5b}), 2,27 (2H, m, H^6), 2,40 (1H, m, H^{2a}), 2,50 (1H, m, H^1), 2,55 (1H, m, H^{2b}), 5,07 (4H, m, 2 x OCH_2), 7,26 (10H, m, H^{ar}) 12,08 (1H, s, OH).

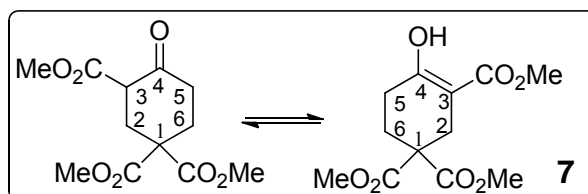
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 24,2 (C^5), 24,8 (C^6), 28,1 (C^2), 39,2 (C^1), 65,9 et 66,4 (OCH_2), 96,2 (C^3), 127,9, 128,0, 128,2, 128,5, 128,6 (CH^{ar}), 135,9 et 136,0 (Car), 171,6 (C^4), 171,9 (C^7), 174,4 (C^8).

IR (film, cm^{-1}) : 3379 (O-H ν), 3033 (C-H ar ν), 2945 (C-H alk ν), 1731 (C=O ester ν), 1652 (C=C ν), 1452 et 1311 (C-H δ), 1269 et 1159 (C-O ester ν).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}$: 389,1365, exp : 389,137.

Analyses élémentaires : calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_5$ (%) C : 73,40, H : 6,37.
trouvé (%) C : 73,46, H : 6,42.

4-oxocyclohexane-1,1,3-tricarboxylate de triméthyle 7 ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$, 272,25 g/mol)



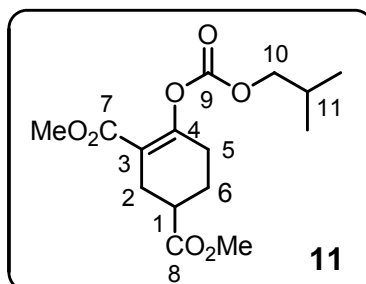
Du NaH (1,5 g de suspension à 60 % dans l'huile minérale, 37,5 mmol) est lavé avec du cyclohexane (2 x 10 mL) puis repris avec du THF anhydre (10 mL). A cette suspension, on ajoute goutte à goutte une solution de malonate de diméthyle (2 g, 15 mmol) dans le THF anhydre (5 mL) puis une solution d'acrylate de méthyle (2,74 g, 30,7 mmol) dans le THF anhydre (5 mL). Le milieu est agité à 0°C pendant 5 minutes puis à température ambiante pendant une nuit. Le milieu est ensuite neutralisé avec de l'acide acétique 3M (8 mL). On additionne H_2O (9 mL). La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (10 mL). La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : pentane / Et_2O : 7/3). Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (1,67 g, 41 %).

Le produit en solution se présente sous sa forme énol.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,15 (2H, t, $J = 6,7$ Hz, H^6), 2,59 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H^5), 2,74 (2H, s, H^2), 3,67 (3H, s, OCH_3), 3,71 (3H, s, OCH_3), 12,03 (1H, s, OH).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 26,0 (C^5), 26,7 (C^6), 27,9 (C^2), 51,6 (OCH_3) 52,5 (C^1), 52,8 (OCH_3), 94,5 (C^3), 170,2 (C^4), 171,1 (C^7), 172,16 (C^8).

4-(isobutoxycarbonyloxy)cyclohex-3-ene-1,3-dicarboxylate de diméthyle 11 ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_7$, 314,3310 g/mol)



A une solution de composé 4 (3,82 g, 17,83 mmol) dans le toluène anhydre (60 mL), est ajouté de la triéthylamine (26,74 mmol, 3,72 mL) puis de l'IBCF (19,58 mmol, 2,55 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h à température ambiante puis filtré, le solide est

rincé avec Et₂O et le filtrat est évaporé. On isole le produit sous la forme d'une huile jaune (5,6 g, quantitatif).

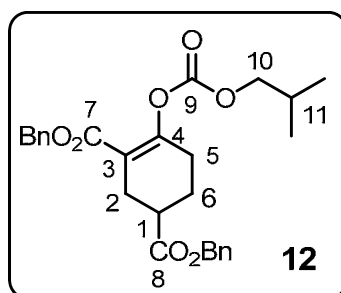
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,95 (6H, d, J = 6,7 Hz, CH₃), 1,83 (1H, m, H^{6a}), 1,98 (1H, m, H¹¹), 2,08 (1H, m, H^{6b}), 2,38 (2H, m, H⁵), 2,58 (2H, m, H¹ et H^{2a}), 2,7 (1H, m, H^{2b}), 3,68 (3H, s, OCH₃), 3,69 (3H, s, OCH₃), 3,96 (2H, d, J = 6,7 Hz, H¹⁰).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 18,92 (CH₃), 24,39 (C⁶), 27,36 (C²), 27,79 (C¹¹), 28,07 (C⁵), 38,33 (C¹), 66,67 et 66,67 (OCH₃), 74,86 (C¹⁰), 116,33 (C³), 152,26 (C⁹), 154,93 (C⁴), 165,25 (C⁷), 174,5 (C⁸).

IR (film, cm⁻¹) : 3396 (C-H ar v), 2957 (C-H alk v), 1731 (C=O ester v), 1667 (C=C v), 1436 et 1371 (C-H δ), 1244 et 1197 (C-O ester v).

SM (ES+) m/z calculé pour C₁₅H₂₂O₇Na : 337,1257, exp : 337,1263.

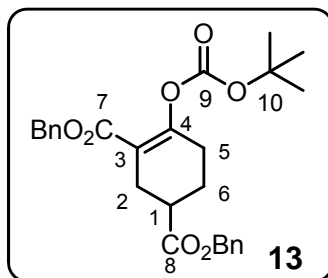
4-(isobutoxycarbonyloxy)cyclohex-3-ene-1,3-dicarboxylate de dibenzyle 12 (C₂₇H₃₀O₆, 450,52 g/mol)



A une solution de composé **6** (0,372 g, 1,02 mmol) dans le toluène anhydre (10 mL), on ajoute de la triéthylamine (1,52 mmol, 0,211 mL) puis de l'IBCF (1,12 mmol, 0,146 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 heures à température ambiante puis filtré, le solide est rincé avec Et₂O et le filtrat est évaporé. On isole le produit sous la forme d'une huile incolore (0,47 g, quantitatif).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,94 (6H, d, J = 6,7 Hz, CH₃), 1,89 (2H, m, H^{6a} et H¹¹), 2,13 (1H, m, H^{6b}), 2,39 (1H, m, H⁵), 2,66 (2H, m, H¹ et H^{2a}), 2,82 (1H, m, H^{2b}), 3,79 (2H, d, J = 6,8 Hz, H¹⁰), 5,14 (4H, m, OCH₂), 7,25 (10H, m, H^{ar}).

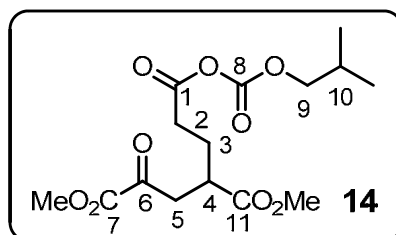
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 18,86 (2 CH₃), 24,39 (C⁶), 27,39 (C²), 27,79 (C¹¹), 28,07 (C⁵), 38,33 (C¹), 66,63 et 66,67 (OCH₂), 74,85 (C¹⁰), 116,3 (C³), 128,19, 128,31, 128,38, 128,61, 128,70 (CH^{ar}), 135,81 et 135,91 (C^{ar}), 152,20 (C⁹), 155,13 (C⁴), 164,81 (C⁷), 173,97 (C⁸).

4-(tert-butoxycarbonyloxy)cyclohex-3-ene-1,3-dicarboxylate de dibenzyle 13 (C₂₇H₃₀O₇, 466,52 g/mol)

A une solution de composé 6 (0,3 g, 0,82 mmol) dans le toluène anhydre (10 mL) est ajouté du DMAP (0,015 g 0,12 mmol) puis du BOC₂ (0,196 g, 0,90 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 50 min à température ambiante. Une solution de KHSO₄ 0,5 M (15 mL) est ajoutée. La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (2 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. On isole le produit sous la forme d'une huile jaune (0,38 g, quantitatif).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,43 (9H, s, CH₃), 1,87 (1H, m, H^{6a}), 2,12 (2H, m, H^{6b}), 2,38 (2H, m, H⁵), 2,65 (2H, m, H¹ et H^{2a}), 2,81 (2H, dd, J = 11,8 et 1,52 Hz, H^{2b}), 5,13 (2H, d, J = 2,5 Hz, OCH₂), 5,17 (2H, d, J = 1,3 Hz, OCH₂), 7,25 (10H, s, H^{ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 24,56 (C⁶), 27,46 (C²), 27,68 (3 x CH₃), 28,35 (C⁵), 38,27 (C¹), 66,53 (OCH₂), 66,61 (OCH₂), 83,69 (C¹⁰), 116,39 (C³), 128,13, 128,18, 128,37, 128,62, 128,71, (CH^{ar}), 136 (C^{ar}), 150,38 (C⁹), 155,21 (C⁴), 164,88 (C⁷), 174,08 (C⁸).

Anhydride (isobutyl carbonique)-7-méthoxy-4-(méthoxycarbonyl)-6,7-dioxoheptanoïque 14 (C₁₅H₂₂O₉, 346,33 g/mol)

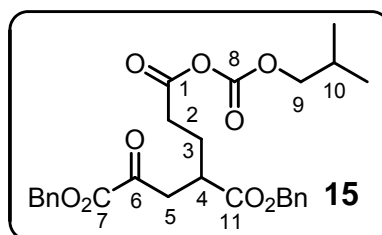
Une solution de composé 11 (1 g, 3,18 mmol), dans CH₂Cl₂ anhydre (40 mL) est refroidie à -70°C puis saturée par un flux d'O₃ (environ 45 minutes) jusqu'à ce qu'une coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est ensuite éliminé par un flux d'O₂ pur (disparition de la coloration bleu). Le sulfure de diméthyle (0,352 mL, 4,77 mmol) est ensuite ajouté et le milieu est agité pendant une nuit à température ambiante. Le produit n'est pas isolé mais utilisé directement dans l'étape suivante.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,95 (6H, d, J = 6,7 Hz, CH₃), 1,98 (3H, m, H³ et H¹⁰), 2,55 (2H, m, H²), 2,97 (2H, m, H⁴ et H^{5a}), 3,35 (2H, m, H^{5a}), 3,68 (3H, s, OCH₃), 3,89 (3H, s, OCH₃), 4,03 (2H, d, J = 6,6 Hz, H⁹).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 18,81 (CH_3), 25,88 (C^3), 27,66 (C^{10}), 31,27 (C^2), 38,87 (C^4), 40,86 (C^5), 52,16 (OCH_3), 53,22 (OCH_3) 75,71 (C^9), 148,98 (C^8), 160,78 (C^7), 167,21 (C^{11}), 173,94 (C^1), 191,60 (C^6).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_9\text{Na}$: 369,1148, exp : 369,1162.

Anhydride (isobutyle carbonique)-7-benzyloxy-4-benzyloxycarbonyl-6,7-dioxoheptanoïque 15 ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_9$, 498,52 g/mol)

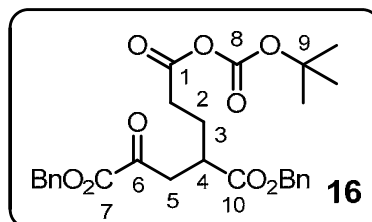


Une solution de composé **12** (0,469 g, 1 mmol), dans CH_2Cl_2 anhydre (20 mL) est refroidie à -70°C puis saturée par un flux d' O_3 (environ 45 minutes) jusqu'à ce qu'une coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est ensuite éliminé par un flux d' O_2 pur (disparition de la coloration bleu). Le sulfure de diméthyle (0,111 mL, 1,51 mmol) est ensuite ajouté et le milieu est agité pendant une nuit à température ambiante. Le produit n'est pas isolé mais utilisé directement dans l'étape suivante.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0,94 (6H, d, $J = 6,7$ Hz, CH_3), 1,97 (3H, m, H^3 , H^{10}), 2,47 (2H, m, H^2), 2,97 (2H, m, H^4 et H^{5a}), 3,33 (2H, dd, $J = 6,8$ et $18,2$ Hz, H^{5a}), 4,02 (2H, d, $J = 6,7$ Hz, H^9), 5,1 (2H, s, OCH_2), 5,25 (2H, s, OCH_2), 7,30 (10H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 18,79 (2 x CH_3), 25,89 (C^3), 27,63 (C^{10}), 31,59 (C^2), 38,89 (C^4), 40,86 (C^5), 67,03 (OCH_2), 68,22 (OCH_2) 75,64 (C^9), 128,32, 128,44, 128,66, 128,78, 128,90 (CH^{ar}), 134,35, 135,46, (C^{ar}), 148,93 (C^8), 160,06 (C^7), 167,15 (C^1), 173,31 (C^{11}), 191,52 (C^6).

Anhydride (tert-butyle carbonique) 7-benzyloxy-4-benzyloxycarbonyl-6,7-dioxoheptanoïque 16 ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_9$, 498,52 g/mol)

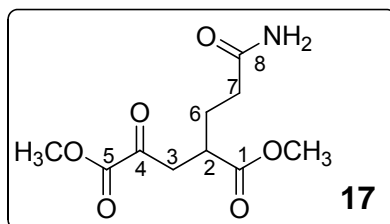


Une solution de composé **13** (0,382 g, 0,82 mmol), dans CH_2Cl_2 anhydre (20 mL) est refroidie à -70°C puis saturée par un flux d' O_3 (environ 30 minutes) jusqu'à ce qu'une coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est alors éliminé par un flux d' O_2 pur (disparition de la coloration bleue). Le sulfure de diméthyle (0,091 mL, 1,23 mmol) est ensuite ajouté et le milieu est agité pendant une nuit à température ambiante. Le produit n'est pas isolé mais utilisé directement dans l'étape suivante.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,52 (9H, d, CH_3), 1,97 (2H, m, H^2), 2,47 (2H, m, H^3), 2,98 (2H, m, H^{5a} et H^4), 3,33 (2H, dd, $J = 8,5$ et $18,4$ Hz, H^{5b}), 5,11 (2H, s, OCH_2), 5,25 (2H, s, OCH_2), 7,35 (10H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 26,62 (C^3), 27,65 (3 x CH_3), 31,62 (C^2), 39,01 (C^4), 40,94 (C^5), 40,97 (C^9), 67,08 (OCH_2), 68,28 (OCH_2) 128,36, 128,48, 128,71, 128,83, 128,96, (CH^{ar}), 134,39, 135,51 (C^{ar}), 146,268 (C^8), 160,15 (C^7), 167,69 (C^1), 173,41 (C^{10}), 191,59 (C^6).

2-(3-amino-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 17 ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_6\text{N}$, 245,23 g/mol)



A une solution du composé **14** (3,64 g, 10,5 mmol) dans le CH_2Cl_2 , est ajoutée une solution d'ammoniac dans le THF 0,5 M (35 mL, 10,5 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 30 minutes. Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 2/8). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (2,72 g, **84 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,97 (2H, m, H^6), 2,29 (2H, m, H^7), 2,96 (1H, m, H^2), 2,97 (1H, dd, $J = 5$ et 20 Hz H^{3a}), 3,30 (1H, dd, $J = 10$ et 20 Hz H^{3b}), 3,67 et 3,86 (3H, s, OCH_3), 5,72 (1H, s élargi, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 26,9 (C^6), 32,8 (C^7), 39,2 (C^2), 40,9 (C^3), 52,1 et 53,1 (OCH_3), 160,8 (C^5), 174,2 et 174,3 (C^1 et C^8), 191,9 (C^4).

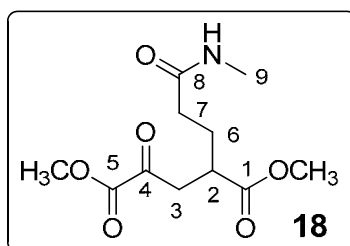
IR (film, cm^{-1}) : 3453 et 3363 (N-H v), 3010 et 2957 (C-H alk v), 1730 (C=O ester v), 1667 (C=O amide v), 1440 et 1396 (C-H δ), 1269 et 1173 (C-O ester v).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{Na}$: 268,0797, exp : 268,0798.

Analyses élémentaires : calculé pour $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_6\text{N}$ (%) C : 48,98, H : 6,17, N : 5,71.

trouvé (%) C : 49,12, H : 6,22, N : 5,54.

2-(3-(méthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 18 ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{N}$, 259,26 g/mol)



A une solution du composé **14** (0,832 g, 2,4 mmol) dans le CH_2Cl_2 (30 mL), est ajoutée une solution de chlorhydrate de méthylamine (0,178 g, 2,64 mmol) et de diisopropylamine (0,457 mL, 2,64 mmol) dans le DMSO (1,4 mL). Le milieu est agité à

température ambiante pendant 30 h. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution de KHSO_4 0,5 M (15 mL) puis avec H_2O (15 mL). Les phases aqueuses sont extraites avec CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 5/5 puis 3/7). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0,456 g, **78 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,92 (2H, m, H^6), 2,34 (2H, t, H^7), 2,72 (3H, d, $J = 4,8$ Hz, H^9), 2,86 (1H, m, H^2), 2,90 (1H, dd, $J = 4,3$ et 20,0 Hz, H^{3a}), 3,24 (1H, dd, $J = 10,1$ et 20,0 Hz, H^{3b}), 3,80 et 3,61 (3H, s, OCH_3), 6,03 (1H, s élargi, NH).

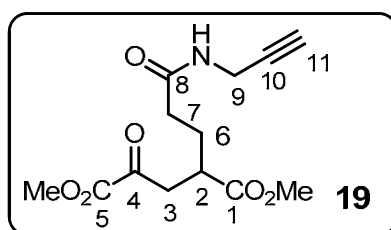
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 26,3 (C^9), 27,3 (C^6), 33,4 (C^7), 39,2 (C^2), 40,9 (C^3), 52,0 et 53,1 (OCH_3), 160,7 (C^5), 172,3 (C^8), 174,4 (C^1), 192,0 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 3394 et 3313 (N-H ν), 2947 (C-H alk ν), 1735 (C=O ester ν), 1652 (C=O amide ν), 1554 (N-H δ), 1436 et 1384 (C-H δ), 1264 et 1170 (C-O ester ν).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{Na}$: 282,0954, exp: 282,0968.

Analyses élémentaires : calculé pour $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{N}$ (%) C : 50,96, H : 6,61, N : 5,40.
trouvé (%) C : 50,73, H : 6,65, N : 5,41.

2-(3-(prop-2-ynylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 19 ($\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_6$, 283,28 g/mol)



A une solution du composé **14** (0,2 g, 0,58 mmol) dans le CH_2Cl_2 (10 mL) est ajoutée la propargylamine (0,041 mL, 0,64 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution de KHSO_4 0,5 M (5 mL) puis avec H_2O (10 mL). La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane / AcOEt : 5/5, 3/7). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,154 g, **94 %**).

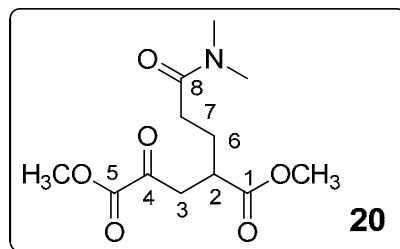
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,98 (2H, m, H^6), 2,26 (3H, m, H^7 et H^{11}), 2,96 (2H, m, H^2 et H^{3a}), 3,32 (1H, dd, $J = 10,0$ et 19,7 Hz, H^{3b}), 3,68 (3H, s, OCH_3), 3,87 (3H, s, OCH_3), 4,04 (2H, dd, $J = 2,5$ et 5,3 Hz, H^9), 5,78 (1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 27,20 (C^6), 29,35 (C^{11}), 33,51 (C^7), 39,29 (C^2), 41,06 (C^3), 52,31 (OCH_3), 53,28 (OCH_3), 71,82 (C^9), 79,54 (C^{10}), 160,91 (C^5), 171,39 (C^8), 174,45 (C^1), 191,97 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 3461 (N-H et C-H alcyne ν), 2954 (C-H alk ν), 2268 ($\text{C}\equiv\text{C}$ ν), 1736 (C=O ester ν), 1537 (N-H ν), 1437 et 1391 (C-H δ), 1264 et 1166 (C-O ester ν).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_6$: 306, 0940, exp: 306, 0954

Analyses élémentaires calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_6$ (%) C : 55,12, H : 6,05, N : 4,94
trouvé (%) C : 54,95, H : 6,14, N : 5,08

2-(3-(diméthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 20 (C₁₂H₁₉NO₆, 273,28g/mol)

A une solution du composé **14** (1,65 g, 4,77 mmol) dans le CH₂Cl₂ (40 mL), est ajoutée une solution de diméthylamine 2M dans le THF (2,38 mL, 5,24 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution de KHSO₄ 0,5 M (30 mL) puis avec H₂O (30 mL). La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH : 97/3). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (1,15 g, **90 %**).

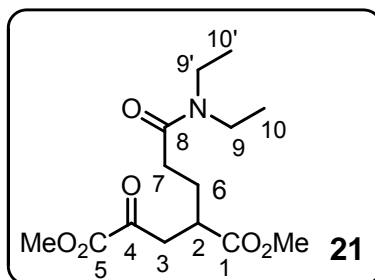
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,88 (2H, m, H⁶), 2,34 (2H, t, J = 7,2 Hz, H⁷), 2,44 (8H, m, H² H^{3a} et CH₃), 3,29 (1H, dd, J = 10 et 19,6 Hz, H^{3b}), 3,64 (3H, s, OCH₃), 3,84 (3H, s, OCH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 26,55 et 26,79 (C⁶), 30,44 et 31,197 (C⁷), 35,49 et 37,14 (CH₃), 39,13 et 39,33 (C²), 40,73 et 40,97 (C³), 52,04 et 53,07 (OCH₃), 160,86 (C⁵), 171,73 (C⁸), 174,59 (C¹), 191,92 (C⁴).

IR (film, cm⁻¹) : 2955 (C-H alk v), 1730 (C=O ester et cétone v), 1641 (C=O amide v), 1437 et 1400 (C-H δ), 1261 et 1189 (C-O ester v).

SM (ES+) m/z calculé pour C₁₂H₁₉NO₆ : 274,1280, exp: 274,1291.

Analyses élémentaires : calculé pour C₁₂H₁₉NO₆ 0,5 H₂O C : 51,06, H : 7,14, N : 4,96
trouvé (%) C : 51,53, H : 7,01, N : 4,87.

2-(3-diéthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 21 (C₁₄H₂₃NO₆, 301,34g/mol)

A une solution du composé **14** (0,554 g, 1,6 mmol) dans le CH₂Cl₂ (15 mL) est ajoutée la diéthylamine (0,200 mL, 1,92 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 heures puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 5/5 puis 3/7). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,263 g, **54 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,07 (3H, t, $J = 7,1$ Hz, H^{10}), 1,13 (3H, t, $J = 7,11$ Hz $\text{H}^{10'}$), 1,59 (2H, m, H^6), 2,33 (2H, t, $J = 7,2$ Hz, H^7), 2,95 (2H, m, H^4 et H^{3a}), 3,28 (5H, m, H^{3a} et H^9 , $\text{H}^{9'}$), 3,64 (3H, s, OCH_3), 3,84 (3H, s, OCH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 13,09 et 14,26 (C^{10} , $\text{C}^{10'}$), 27,02 (C^6), 30,23 (C^7), 39,42 (C^2), 40,27 (C^9), 41,04 (C^3), 41,89 ($\text{C}^{9'}$), 52,05 (OCH_3), 53,10 (OCH_3), 160,91 (C^5), 170,68 (C^8), 174,68 (C^1), 191,98 (C^4).

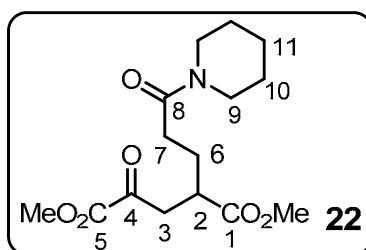
IR (film, cm^{-1}) : 2953 -2900 (C-H alk v), 1761 (C=O ester et cétone v), 1667 (C=O amide v), 1435 (C-H δ), 1271 et 1172 (C-O ester v)

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{NO}_6$: 302, 1589, exp: 302, 1604

Analyses élémentaires calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_6$ (%) C : 55,80, H : 7,69, N: 4,65

Trouvé (%) C : 55,26, H : 7,80, N: 4,64

2-(3-(pipéridin-1-yl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 22 ($\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_6$, 313,35 g/mol)



A une solution du composé **14** (1,66 g, 4,8 mmol) dans le CH_2Cl_2 (40 mL) est ajoutée la pipéridine (0,475 mL, 4,8 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution KHSO_4 0,5 M (20 mL) puis avec H_2O (20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 5/5 puis 3/7). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (1,25 g, **83 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,53 (4H, m, H^{10}), 1,63 (2H, m, H^{11}), 1,96 (2H, m, H^6), 2,36 (2H, t, $J = 4$ Hz, H^7), 2,99 (2H, m, H^2 et H^{3a}), 3,3 (1H, dd, $J = 5$ et 10 Hz, H^{3b}), 3,43 (4H, H^9), 3,66 (3H, s, OCH_3), 3,86 (3H, s, OCH_3).

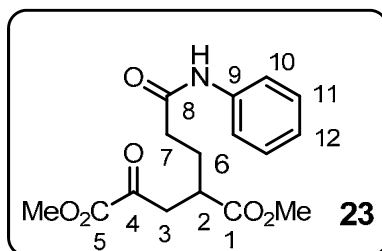
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 24,49 (C^{10} et C^{11}), 29,95 (C^6), 30,36 (C^7), 39,37 (C^2), 40,91 (C^9 et C^3), 52,04 (OCH_3), 53,07 (OCH_3), 160,85 (C^5), 169,82 (C^8), 174,45 (C^1), 191,97 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 2951 (C-H ar v), 2858 (C-H alk v), 1729 (C=O ester et cétone v), 1645 (C=O amide v), 1441 (C-H δ), 1261 et 1171 (C-O ester v)

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_6$: 314, 1595, exp: 314, 1604

Analyses élémentaires calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NO}_6$ (%) C : 57,50, H : 7,33, N: 4,47

Trouvé (%) C : 57,88, H : 7,33, N: 4,59

2-(3-(phénylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 23 (C₁₆H₁₉NO₆, 321,33 g/mol)

A une solution du composé **14** (0,551 g, 1,59 mmol) dans le CH₂Cl₂ (15 mL), est ajoutée de l'aniline (0,159 mL, 1,75 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec une solution de KHSO₄ 0,5 M (10 mL) puis avec H₂O (10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 5/5 puis 3/7). Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,46 g, **89 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,97 (2H, m, H⁶), 2,38 (2H, m, H⁷), 2,92 (2H, m, H² et H^{3a}), 3,28 (1H, dd, J = 10,2 et 19,9 Hz, H^{3b}), 3,61 (3H, s, OCH₃), 3,81 (3H, s, OCH₃), 7,04 (1H, t, J = 7,4 Hz, H¹²), 7,24 (1H, t, J = 7,9 Hz, H¹¹), 7,47 (H¹⁰, d, J = 8 Hz, H¹⁰), 8,09 (1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 27,07 (C⁶), 34,84 (C⁷), 39,22 (C⁴), 40,88 (C³), 52,18 (OCH₃), 53,12 (OCH₃), 119,97 (C¹⁰), 124,26 (C¹²), 128,91 (C¹¹), 137,93 (C⁹), 160,67 (C⁵), 170,42 (C⁸), 174,50 (C¹), 191,99 (C⁴).

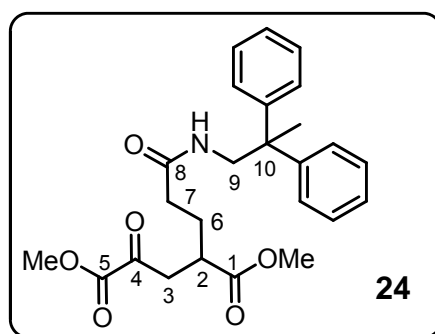
PF = 125°C.

IR (KBR, cm⁻¹) : 3289 et 3139 (N-H ν), 2954 (C-H ar ν), 1731 (C=O ester et cétone ν), 1660 (C=O amide ν), 1537-1518 (N-H et C-H), 1441 et 1392 (C-H δ), 1269 et 1159 (C-O ester ν).

SM (ES+) m/z calculé pour C₁₆H₁₉NO₆: 322, 1281, exp: 322, 1291.

Analyses élémentaires calculé pour C₁₆H₁₉NO₆ (%) C : 59,81, H : 5,96, N : 4,36.

trouvé (%) C : 59,41, H : 6,19, N : 4,28.

2-(3-(2,2-diphénylpropylamino)-3-oxopropyl)-4-oxo-glutarate de diméthyle 24 (C₂₃H₂₉NO₆, 439,50 g/mol)

Le chlorure de 2,2-diphénylpropylamine (0,715 g, 2,88 mmol) est dissous dans H₂O (10 mL) puis le pH est ajusté à 10 avec une solution NaOH 1M. Le précipité formé est extrait avec du CH₂Cl₂ (2 x 30 mL). Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄ concentrées sous pression réduite puis sont ajoutées à une solution du composé **14** (1g, 2,88 mmol) dans le CH₂Cl₂ (30 mL). Le milieu est agité à température ambiante pendant 15 minutes. Le milieu

réactionnel est ensuite lavé avec une solution de KHSO_4 0,5 M (15 mL) puis avec H_2O (20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH : 99/01). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0,991 g, **79 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,66 (3H, s, CH_3), 1,87 (2H, q, $J = 7,2$ Hz, H^6), 2,11 (2H, m, H^7), 2,87 (2H, m, H^2 et H^{3a}), 3,27 (1H, m, H^{3b}), 3,62 (3H, s, OCH_3), 3,87 (3H, s, OCH_3), 6,24 (2H, ddd, $J = 5,6, 13,2$ et $18,8$ Hz, H^9), 5,9 (1H, t, $J = 6$ Hz, NH), 7,26 (10H, m, H^{ar}).

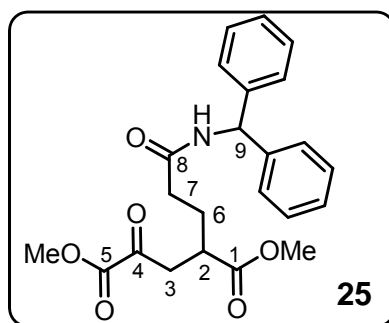
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 26,51 (CH_3), 27,33 (C^6), 33,77 (C^7), 39,09 (C^2), 40,93 (C^3), 47,14 (C^{10}), 48,58 (C^9), 52,08 (OCH_3), 53,12 (OCH_3), 126,48, 127,34, 128,47, (CH^{ar}), 146,64 (C^{ar}), 160,74 (C^5), 171,66 (C^8), 174,36 (C^1), 191,79 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 3441 (N-H ν), 3088 et 3023 (C-H ar ν), 2953 (C-H alk ν), 1736 (C=O ester et cétone ν), 1682 (C=O amide ν), 1511 (N-H et C-H ar δ), 1445 (C-H δ), 1264 et 1168 (C-O ester ν), 1073 (C-H ar δ).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{NO}_6$: 440, 2080, exp: 440, 2073.

Analyses élémentaires calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_6$ (%) C : 68,32, H : 6,65, N : 3,19.
trouvé (%) C : 67,97, H : 6,73, N : 3,19.

2-(3-(benzhydrylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 25 ($\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_6$, 411,45 g/mol)



A une solution du composé **14** (0,349 g, 1 mmol) dans le CH_2Cl_2 (15 mL) est ajoutée la diphenylméthylamine (0,181 mL, 1,05 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 h. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution de KHSO_4 0,5 M (10 mL) puis avec par H_2O (10 mL). La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH 99/01). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0,254 g, **61 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,98 (2H, m, H^6), 2,38 (2H, m, H^7), 2,93 (2H, m, H^2 et H^{3a}), 3,31 (1H, dd, $J = 10$ et $19,6$ Hz, H^{3b}), 3,66 (3H, s, OCH_3), 3,86 (3H, s, OCH_3), 6,24 (2H, s, H^9 et NH), 7,24 (10H, m, H^{ar}).

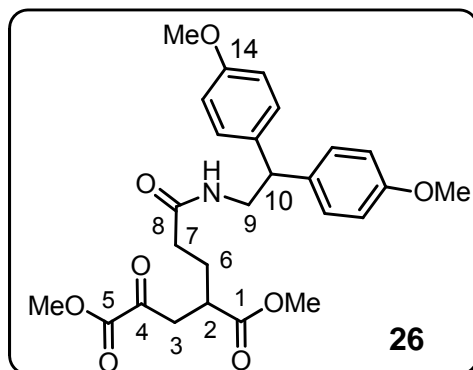
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 27,58 (C^6), 33,77 (C^7), 39,48 (C^2), 41,62 (C^3), 52,03 (OCH_3), 53,04 (OCH_3), 57,31 (C^9), 127,46, 127,53, 127,62, 128,83 (CH^{ar}), 141,91 (C^{ar}), 161,01 (C^5), 170,76 (C^8), 174,57 (C^1), 191,17 (C^4).

IR (KBR, cm^{-1}) : 3281 (N-H ν), 3045 (C-H ar ν), 2953 (C-H alk ν), 1732 (C=O ester et cétone ν), 1645 (C=O amide ν), 1533-1494 (N-H et C-H ar δ), 1437 et 1388 (C-H δ), 1263 et 1170 (C-O ester ν), 1068 (C-H ar δ).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{NO}_6$: 412, 1776, exp: 412, 1760.

Analyses élémentaires calculé pour $C_{23}H_{25}NO_6$ 0,5 H_2O (%) C : 65,70, H : 6,23, N: 3,33
trouvé (%) C : 66,13, H : 6,24, N: 3,48

2-(3-(2,2-bis(4-méthoxyphényl)éthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 26
($C_{26}H_{31}NO_8$, 485,53 g/mol)



Mode opératoire

A une solution du composé **14** (0,912 g, 2,63 mmol) dans le CH_2Cl_2 (30 mL), est ajoutée la 2,2-bis(4-méthoxyphényl)éthanamine (0,678 g, 2,63 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 16 minutes. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution de $KHSO_4$ 0,5M (15 mL) puis avec H_2O (20 mL). La phase organique est ensuite séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH : 99/01). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0,991 g, **78 %**).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,87 (2H, m, H^6), 2,11 (2H, m, H^7), 2,8 (1H, m, H^2), 2,88 (2H, dd, $J = 4,4$ et 18,8 Hz, H^{3a}), 3,26 (1H, dd, $J = 9,2$ et 18,8 Hz, H^{3b}), 3,62 (3H, s, OCH_3), 3,77 (6H, s, OCH_3), 3,83 (2H, m, H^9), 3,87 (3H, s, OCH_3), 4,08 (1H, t, $J = 8$ Hz, H^{10}), 5,49 (1H, t, $J = 4,8$ Hz, NH), 6,83 (4H, dd, $J = 1,6$ et 8,4 Hz, H^{ar}), 7,13 (4H, d, $J = 8,8$ Hz, H^{ar}).

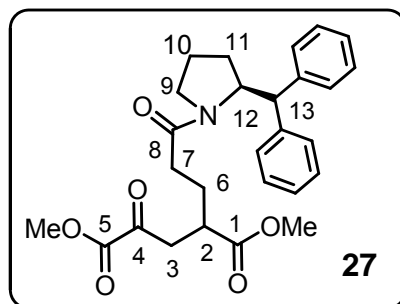
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 27,27 (C^6), 33,76 (C^7), 39,14 (C^2), 40,01 (C^3), 44,14 (C^9), 49,05 (C^{10}), 52,17 (OCH_3), 53,21 (OCH_3), 55,33 (OCH_3), 114,18, 128,98 (CH^{ar}), 134,22, 134,25 (C^{ar}), 158,31 (C^{14}), 160,7 (C^5), 171,49 (C^8), 174,36 (C^1), 191,75 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 3444 (N-H ν), 3001 (C-H ar ν), 2953 (C-H alk ν), 1736 (C=O ester et cétone ν), 1681 (C=O amide ν), 1510 (N-H et C-H ar δ), 1439 (C-H δ), 1249 et 1176 (C-O ester ν), 1041 (C-H ar δ).

SM (ES+) m/z calculé pour $C_{26}H_{30}NO_8$: 486, 2144, exp: 486, 2128.

Analyses élémentaires calculé pour $C_{26}H_{31}NO_8$ (%) C : 64,32, H : 6,44, N: 2,88.
trouvé (%) C : 64,27, H : 6,50, N: 2,94.

2-(3-((S)-2-benzhydrylpyrrolidin-1-yl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 27
(C₂₇H₃₁NO₆ 465,54 g/mol)



A une solution du composé **14** (0,912 g, 2,63 mmol), est ajoutée la (S)-2-benzhydrylpyrrolidine (0,625 g, 2,63 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 15 min. Le milieu réactionnel est lavée avec une solution de KHSO₄ 0,5M (5 mL) puis avec H₂O (5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH : 99/01). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0,949 g, **77,5** %).

On observe par RMN la présence de 4 isomères (rotamères autour des liaisons C⁸-N et C¹²-C¹³).

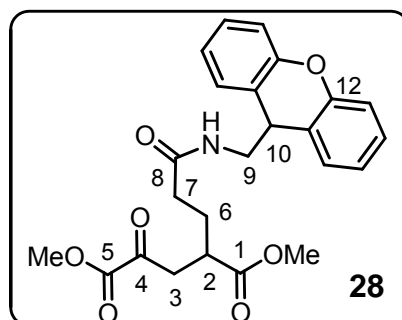
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,6–2,1 (7H, m, H⁷, H¹¹ et H¹⁰), 2,26 (1H, m, H⁷), 2,62–2,98 (2H, m, H³), 3,13–3,3 (2H, m, H⁹) 3,45 (1H, m, H²), 3,62, 3,64, 3,69 et 3,7 (3H, s, OCH₃), 3,8 (16H, m, H²), 3,87 et 3,88 (3H, s, OCH₃) 3,96 (1H, m, H¹³), 3,98 (1H, m, H¹³), 4,5 (1H, m, H¹²), 4,55 (1H, m, H¹³), 4,57 (1H, m, H¹³), 5,02 (1H, m, H¹²), 7,05–7,04 (10H, m H^{ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 23,5 et 21,2 (C¹¹) 26,45, 26,52, 26,7, 26,8(C⁶), 27,6 et 27,5 (C¹⁰), 30,3, 30,4, 32, 32,1 (C⁷), 39–39,5 (C²), 40,6, 40,8, 40,9, 41,1(C³), 44,87, 44,93, 46,75, 46,78 (C⁹), 52 et 52,1 (C¹³), 53 et 54,1 (OCH₃), 60, 61,9, 62 (C¹²), 126,1–129,6 (CH^{ar}), 140,7, 141,5, 142, 142,2 (C^{ar}), 160,9 (C¹), 171,1 et 170,4 (C⁸), 174,7 et 174,5 (C⁵), 192 (C⁴).

IR (film, cm⁻¹) : 3444 (N-H ν), 3001 (C-H ar ν), 2955 (C-H alk ν), 1732 (C=O ester et cétone ν), 1626 (C=O amide ν), 1495 (N-H et C-H ar δ), 1437 (C-H δ), 1266 et 1172 (C-O ester ν), 1077 (C-H ar δ).

Analyses élémentaires calculé pour C₂₇H₃₁NO₆ (%) C : 69,66, H : 6,71, N : 3,01.
trouvé (%) C : 70,35, H : 6,3, N : 2,63.

2-(3-((9H-xanthèn-9-yl)méthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 28
(C₂₄H₂₅NO₇, 439,46 g/mol)



A une solution du composé **14** (1,43 g, 4,135 mmol) dans le CH_2Cl_2 (35 mL), est ajoutée une solution du composé **29** (1,05 g, 4,96 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution de KHSO_4 0,5 M (10 mL) puis avec H_2O (10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH : 97/3). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (1,43 g, **79 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,9 (2H, m, H^6), 2,13 (2H, m, H^7), 2,87 (2H, m, H^2 , et H^{3a}), 3,26 (1H, dd, $J = 8,8$ et $18,4$ Hz, H^{3b}), 3,42 (2H, m, H^9) 3,64 (3H, s, OCH_3), 3,84 (3H, s, OCH_3), 4,16 (1H, t, $J = 6,4$ Hz, H^{10}) 5,66 (1H, s, $J = 6$ Hz, NH), 7,07 (4H, H^{ar}), 7,23 (4H, H^{ar}).

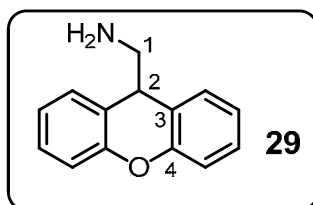
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 27,14 (C^6) δ 33,58 (C^7), 38,98 (C^{10}), 39,20 (C^2), 40,86 (C^3), 47,34 (C^9) 52,13 (OCH_3), 53,15 (OCH_3), 116,57 (CH^{ar}), 122,69, 122,71 (C^{ar}), 123,53, 128,33 et 129 (CH^{ar}), 152,27 (C^{12}), 160,8 (C^5), 171,77 (C^8), 174,40 (C^1), 191,88 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 3455 (N-H ν), 3044 (C-H ar ν), 2953 (C-H alk ν), 1736 (C=O ester et cétone ν), 1682 (C=O amide ν), 1508 (N-H et C-H ar δ), 1429 (C-H δ), 1265 et 1170 (C-O ester ν), 1070 (C-H ar δ).

SM (ES $^+$) m/z calculé pour $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{NO}_7$: 440, 1696, exp: 440, 1709.

Analyses élémentaires calculé pour $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_7$ 0,5 H_2O (%) C : 64,24, H : 5,84, N : 3,12.
trouvé (%) C : 64,62, H : 5,66, N : 3,22.

(9H-xanthèn-9-yl) méthanamine **29** ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}$, 211,26 g/mol)

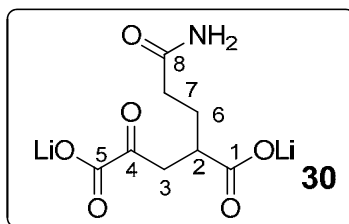


Le 9H-xanthène-9-carboxamide (2,5 g, 11,09 mmol) est dissous dans un mélange toluène/ Et_2O 1 : 1 (200 mL). Le LiAlH_4 (2,10 g, 55,45 mmol) est ensuite ajouté. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 24 h. On ajoute lentement H_2O (2,1 mL), NaOH 15 % (2,1 mL), puis H_2O (6 mL) sous forte agitation pendant 2 h. Le milieu est filtré sur célite et concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH : 95/5). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (1,5 g, **64 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,17 (1H, s, NH), 2,85 (2H, d $J = 5,3$ Hz, H^1), 3,88 (1H, t, $J = 4,5$ Hz, H^2), 7,08 (8H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 42,75 (C^2), 51,19 (C^1), 116,55 (CH^{ar}), 123,05 (C^3), 123,42 (CH^{ar}), 128,08 (CH^{ar}), 128,78 (CH^{ar}), 152,50 (C^4).

SM (ES $^+$) m/z calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$: 212, 1076, exp: 212, 1075.

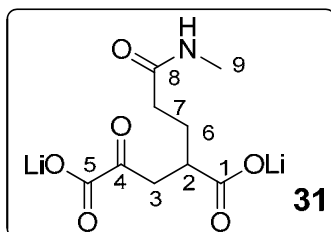
2-(3-(amino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 30 (C₈H₉NO₆Li₂, 229,04 g/mol)

Le composé **17** (0,176 g, 0,77 mmol) est dissous dans MeOH (4 mL), une solution aqueuse de LiOH 0,4 M (4 mL) fraîchement préparée est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Le milieu est concentré sous pression réduite, et le pH est ajusté à 6 par ajout de résine acide (Dowex 50W x8, H⁺). Après filtration et évaporation des solvants, le produit est isolé sous forme d'un solide jaune (0,175 g, quantitatif).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,73 (2H, m, H⁶), 2,22 (2H, m, H⁷), 2,61 (1H, m, H²), 3,82 (1H, dd, J = 5 et 20 Hz, H^{3a}), 3,02 (1H, dd, J = 10 et 20 Hz, H^{3b}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 28,2 (C⁶), 33,0 (C⁷), 42,0 (C³), 42,8 (C²), 169,7 (C⁵), 179,2 (C⁸), 182,6 (C¹), 204,3 (C⁴).

SM (ES⁺) m/z calc pour C₈H₁₀NO₆ : 216,0508, exp: 216,0509.

2-(3-(méthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 31 (C₉H₁₁NO₆Li₂, 243,07 g/mol)

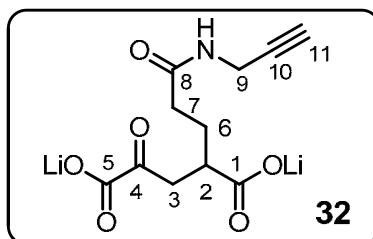
L'hydrolyse des esters méthyliques du composé **18** (0,25 g, 0,96 mmol) a été réalisée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **30**. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,24 g, quantitatif).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,58 (2H, m, H⁶), 2,08 (2H, m, H⁷), 2,47 (1H, m, H²), 2,56 (3H, s, H⁹), 2,71 (1H, dd, J = 5,2 et 18,4 Hz, H^{3a}), 2,89 (1H, dd, J = 8,4 et 18,4 Hz, H^{3b}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 25,8 (C⁹), 28,4 (C⁶), 33,7 (C⁷), 41,0 (C³), 42,6 (C²), 169,8 (C⁵), 176,6 (C⁸), 182,6 (C¹), 204,4 (C⁴).

SM (ES⁻) m/z calculé pour C₉H₁₂NO₆ : 236,0746, exp : 236,0789.

2-(3-(prop-2-ynylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 32 ($C_{11}H_{11}Li_2NO_6$, 267,09 g/mol)



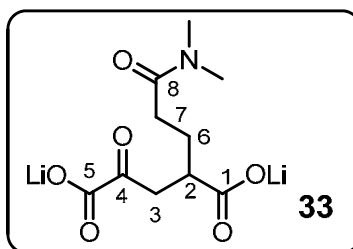
L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 19 (0,518 g, 2,29 mmol) a été réalisée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,489 g, quantitatif).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 1,78 (2H, m, H^6), 2,27 (3H, m, H^7 et H^{11}), 2,64 (2H, m, H^2), 2,87 (1H, dd, $J = 5,6$ et 18 Hz, H^{3a}), 3,06 (1H, dd, $J = 8,4$ et $18,4$ Hz, H^{3b}) 3,95 (2H, s, H^9).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 28,18 (C^6), 28,70 (C^{11}), 33,62 (C^7), 42 (C^3), 42,62 (C^4), 69,73 (C^9), 77,13 (C^{10}), 167,75 (C^1), 173,85 (C^8), 180,50 (C^5), 202,29 (C^2).

SM (ES+) m/z calculé pour $C_{11}H_{13}LiNO_6$: 262, 0919, exp: 262,0903.

2-(3-(diméthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 33 ($C_{10}H_{13}Li_2NO_6$, 257,10 g/mol)

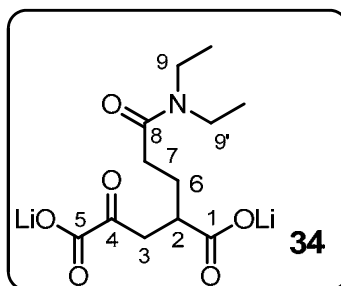


Le composé 20 (0,824 g, 3,02 mmol) a été saponifié suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,776 g, quantitatif).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 1,74 (2H, m, H^6), 2,40 (2H, m, H^7), 2,65 (1H, m, H^2), 3,89 (4H, m, CH_3 , et H^{3a}), 3,05 (4H, m, CH_3 , et H^{3b}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 27,75 (C^6), 30,89 (C^7), 35,47 (CH_3), 37,61 (CH_3) 42,0 (C^3), 42,6 (C^2), 169,92 (C^5), 179,2 (C^8), 182,6 (C^1), 204,3 (C^4).

SM (ES+) m/z calculé pour $C_{10}H_{15}LiNO_6$: 252,1059, exp: 252,1059.

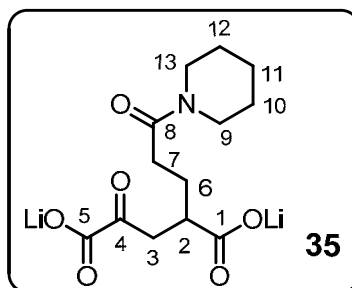
2-(3-(diéthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 34 ($C_{12}H_{17}Li_2NO_6$, 285,15 g/mol)

L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 21 (0,341 g, 1,13 mmol) a été réalisée suivant le protocole décrit précédemment pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,307 g, quantitatif).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 1,05 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, CH_3), 1,14 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, CH_3), 1,72 (2H, m, H^6), 2,36 (2H, m, H^7), 2,6 (1H, m, H^2), 2,84 (1H, dd, $J = 5,6$ et 18,4 Hz, H^{3a}), 3,03 (1H, dd, $J = 8,4$ et 18,4 Hz, H^{3b}), 3,33 (4H, m, H^9).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 12,01 et 13,17 (CH_3), 28,25 (C^6), 30,72 (C^7), 40,72 ($C^{9'}$), 42,07 (C^3), 42,73 (C^4), 42,97 ($C^{9''}$) 169,82 (C^1), 174,70 (C^8), 182,63 (C^5), 204,26 (C^2).

SM (ES+) m/z calculé pour $C_{12}H_{20}NO_6$: 274, 1303, exp: 274, 1291.

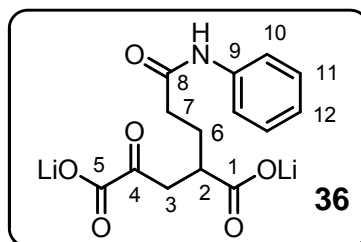
2-(3-(pipéridin-1-yl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 35 ($C_{13}H_{17}Li_2NO_6$, 297,16 g/mol)

L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 22 (1,16 g, 3,7 mmol) a été réalisée suivant le protocole décrit précédemment pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (1,09 g, quantitatif).

RMN 1H (400 MHz, D_2O): δ 1,53 (2H, m, H^{11}), 1,63 (4H, m, H^{10}), 1,75 (2H, m, H^6), 2,66 (2H, H^7), 2,66 (1H, m, H^2), 2,88 (1H, dd, $J = 5,6$ et 18,4 H^{3a}), 3,07 (1H, $J = 8,4$ et 18,4 H^{3b}), 3,48 (4H, t, $J = 5,2$ Hz, H^9).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ 23,69 (C^{11}), 25,26 (C^{10}), 26,03 (C^{12}), 28,22 (C^6), 31,05 (C^7), 42,04 (C^3), 42,79 (C^2), 43,39 (C^9), 47,47 (C^{13}), 169,41 (C^5), 173,54 (C^8), 182,60 (C^1) 204,42 (C^4).

SM (ES+) m/z calculé pour $C_{13}H_{19}LiNO_6$: 292, 1388, exp: 292, 1372.

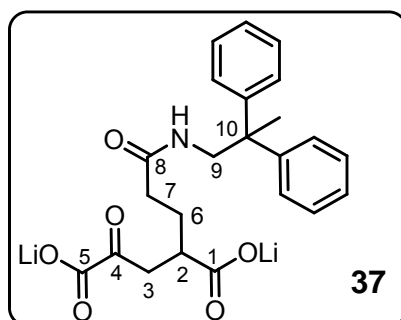
2-(3-(phenylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 36 ($C_{14}H_{13}Li_2NO_6$, 305, 14 g/mol)

L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 23 (0,473 g, 1,47 mmol) a été réalisée suivant le protocole décrit précédemment pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,448 g, quantitatif).

RMN 1H (400 MHz, D_2O): δ 1,88 (2H, m, H^6), 2,44 (4H, m, H^7), 2,71 (1H, m, H^2), 2,92 (1H, dd, $J = 5,6$ et $18,5$ Hz, H^{3a}), 3,11 (1H, dd, $J = 8,5$ et $18,5$ Hz, H^{3b}), 7,26 (1H, m, H^{12}), 7,44 (4H, H^{10} et H^{11}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ 28,30 (C^6), 34,45 (C^7), 42,08 (C^3), 42,66 (C^4), 122,18, 125,59 et 129,15 (CH^{ar}), 136,75 (C^{ar}), 169,87 (C^5), 174,91 (C^8), 182,66 (C^1), 204,35 (C^4).

SM (ES+) m/z calculé pour $C_{14}H_{13}LiNO_6$: 300, 1065, exp: 300, 1059.

2-(3-(2,2-diphénylpropylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 37 ($C_{23}H_{23}Li_2NO_6$, 423,31 g/mol)

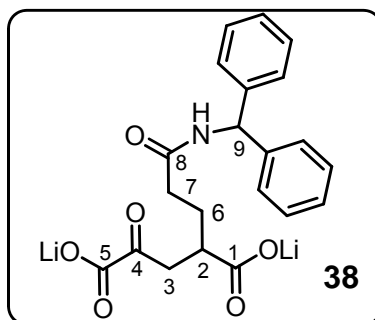
L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 24 (0,554 g, 1,26 mmol) a été réalisée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,533 g, quantitatif).

RMN 1H (400 MHz, D_2O): δ 1,54 (2H, m, H^6), 1,64 (3H, s CH_3), 2,08 (2H, t, $J = 5,6$ Hz, H^7), 2,48 (1H, m, H^2), 2,73 (1H, dd, $J = 5,6$ et $18,8$ Hz, H^{3b}), 2,94 (1H, m, H^{3a}), 3,93 (2H, d, $J = 4,8$ Hz, H^9), 7,29 (10H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ 25,48 (CH_3), 28,46 (C^6), 33,76 (C^7), 41,19 (C^{10}), 42,28 (C^2), 46,84 (C^3), 48,33 (C^9), 126,46, 127,34, 127,37, 128,40 (CH^{ar}), 146,94, 147,04 (C^{ar}), 169,75 (C^5), 175,91 (C^8), 182,39 (C^1).

SM (ES+) m/z calculé pour $C_{23}H_{26}NO_6$: 412, 1779, exp: 412, 1760.

2-(3-(benzhydrylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 38 ($C_{21}H_{19}Li_2NO_6$, 395,26 g/mol)



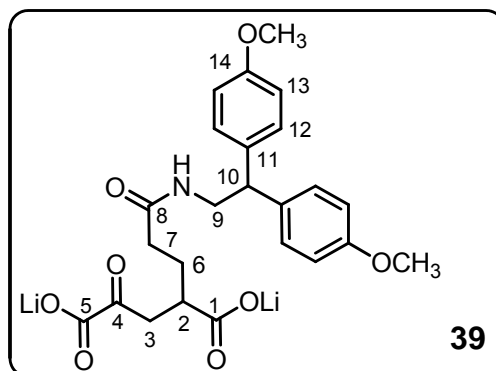
L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 25 (0,383 g, 0,93 mmol) a été réalisée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,367 g, quantitatif).

RMN 1H (400 MHz, D_2O): δ 1,80 (2H, m, H^6), 2,34 (2H, t, $J = 8$ Hz, H^7), 2,64 (2H, m, H^2), 2,83 (1H, dd, $J = 5,2$ et 18 Hz, H^{3a}), 3,03 (2H, $J = 8,8$ et 18 Hz, H^{3b}), 6,04 (1H, s, H^9), 7,33 (10H, m, H^{ar})

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ 28,47 (C^6), 33,75 (C^7), 41,89 (C^3), 42,61 (C^2), 57,47 (C^9), 127,21, 127,23, 127,66, 128,87(CH^{ar}), 140,63 (C^{ar}), 169,96 (C^5), 175,22 (C^8), 182,55 (C^1).

SM (ES+) m/z calculé pour $C_{21}H_{22}NO_6$: 384, 1460, exp: 384, 1447.

2-(3-(2,2-bis(4-méthoxyphényl)éthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 39 ($C_{24}H_{25}Li_2NO_8$, 469,34 g/mol)



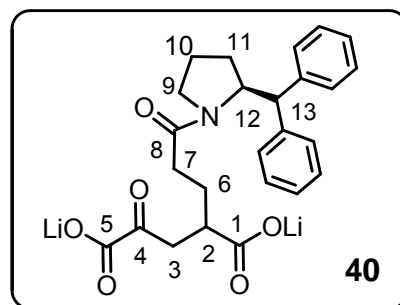
L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 26 (0,580 g, 1,195 mmol) a été réalisée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide violet (0,555 g, quantitatif)

RMN 1H (400 MHz, D_2O): δ 1,45 (1H, m, H^{6a}), 1,56 (1H, H^{6b}), 2,06 (2H, t, $J = 8$ Hz, H^7), 2,41 (1H, m, H^2), 2,67 (1H, dd, $J = 5,2$ et 18,4 Hz, H^{3b}), 2,9 (1H, m, H^{3a}), 3,69 (2H d, $J = 8$ Hz, H^9), 3,72 (6H, s, CH_3), 3,59 (1H, t, $J = 8,4$ Hz, H^{10}), 6,85 (4H, dd, $J = 5,2$ et 18,4 Hz, H^{13}), 7,18 (4H, d, $J = 8,8$ Hz, H^{12}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ 28,51 (C^6), 33,73 (C^7), 41,67 (C^3), 42,22 (C^2), 43,50 (C^9), 48,29 (C^{10}), 55,23 (OCH_3), 114,07 (C^{13}), 128,91 (C^{12}), 134,93 et 157,43 (C^{11} et C^{14}), 169,67 (C^5), 175,68 (C^8), 182,39 (C^1).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{NO}_8$: 458, 1280, exp: 458, 1815.

2-(3-((S)-2-benzhydrylpyrrolidin-1-yl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de lithium 40
($\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{Li}_2\text{NO}_6$, 449,35).



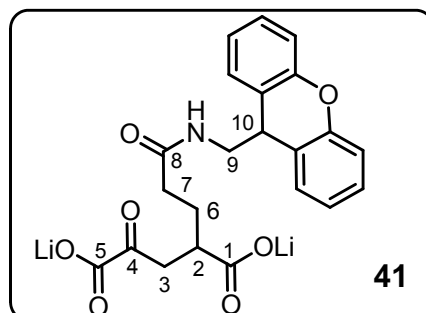
L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 27 (0,9 g, 1,9 mmol) a été saponifiée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,850 g, quantitatif)

On observe par RMN la présence de 4 isomères (rotamères autour des liaisons $\text{C}^8\text{-N}$ et $\text{C}^{12}\text{-C}^{13}$

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0,77–3,04 (12H, m, H^{11} et H^{10} , H^7 , H^6 , H^2 , H^3), 3,29–3,77 (1H, m, H^9), 3,97 (1H, dd, $J = 4,4$ et $10,8$ H^{13}), 4,14 (2H, dd, $J = 2,8$ et $8,8$ H^{13}), 4,73 (1H, m, H^{12}), 4,94 (1H, m, H^{12}), 6,74–7,64 (10H, m H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 20,44 – 32,68 (C^{11} et C^{10} , C^7 , C^6 , C^2 , C^3), 41,94 – 41,47 (C^2), 44,97, 45,02 et 46,62 (C^9), 52,79, 52,83 et 53,29 (C^{13}), 59,63, 62,76 et 62,76 (C^{12}), 126,57–129,11 (CH^{ar}), 140,98, 141,46, 141,72 et 142,09 (C^{ar}), 169,84 (C^1), 173,58 et 173,64 (C^8), 182,12, 182,41, 182,54 et 182,58 (C^5).

2-(3-((9H-xanthèn-9-yl)méthylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 41
($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Li}_2\text{NO}_7$, 423,27 g/mol).



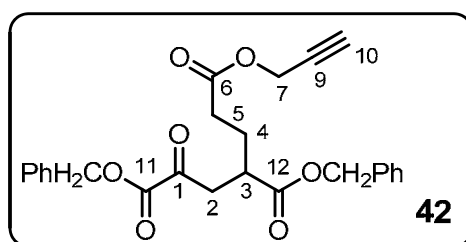
L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 28 (1 g, 2,27 mmol) a été saponifiée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,804 g, 83 %).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 1,52 (1H, m, H^6), 1,99 (2H, t, $J = 8$ Hz, H^7), 2,48 (1H, m, H^2), 2,77 (1H, dd, $J = 5,6$ et $18,4$ Hz, H^{3a}), 2,95 (1H, dd, $J = 8$ et 18 Hz, H^{3b}), 3,32 (2H, m, H^9), 3,98 (1H, t, $J = 5,6$ Hz, H^{10}), 7,13 (8H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ 28,43 (C^6), 33,79 (C^7), 38,59 (C^{10}), 41,8 (C^3), 42,56 (C^2), 46,88 (C^9), 115,94, 123,49, (CH^{ar}), 122,22, (C^{ar}), 128,2, 129,16 (CH^{ar}), 151,51 (C^{12}), 169,67 (C^5), 175,27 (C^8), 182,42 (C^1), 203,54 (C^4).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_7$: 412, 1383, exp: 412, 1396

1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-prop-2-ynyle 42 ($\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_7$, 436,45 g/mol)



A une solution du composé **16** (0,398 g, 0,8 mmol) dans le CH_2Cl_2 (15 mL) sont ajoutées l'alcool propargylique (0,057 mL, 0,96 mmol) puis le DMAP (9,8 mg, 0,08 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 40 min. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution de KHSO_4 0,5 M (15 mL) puis avec H_2O (15 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / ACOEt : 8/2 puis 7/3). Le produit est isolé sous forme d'une huile incolore (0,306 g, **88 %**).

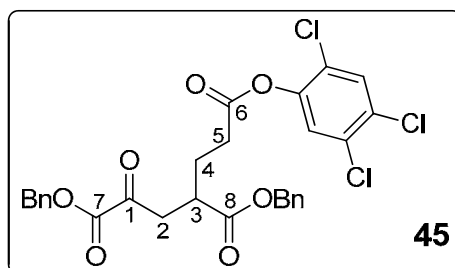
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,95 (2H, m, H^4), 2,39 (2H, m, H^5), 2,47 (1H, t, $J = 2,4$ Hz, H^{10}), 2,98 (2H, m, H^3 et H^{2a}), 3,32 (1H, dd, $J = 8,6$ et $18,3$ Hz, H^{2b}), 4,63 (2H, d, $J = 2,4$ Hz, H^7), 5,10 (2H, OCH_2), 5,25 (2H, OCH_2), 5,10 (2H, OCH_2), 7,64 (10H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 26,36 (C^4), 31,18 (C^5), 39,05 (C^3), 40,74 (C^2), 52,03 (C^9), 66,85 (OCH_2), 68,08 (OCH_2), 75,08 (C^7), 79,54 (C^{10}), 160,91 (C^1), 171,39 (C^8), 174,45 (C^5), 128,21, 128,31, 128,44, 128,57, 128,66, 128,71, 128,81 (CH^{ar}), 134,36, 135,51 (C^{ar}), 160,06 (C^{11}), 171,64 (C^{10}), 173,52 (C^6), 191,62 (C^1).

IR (film, cm^{-1}) : 3450 (O-H v), 3286 (C-H ar v), 2940 (C-H alk v), 2268 ($\text{C}\equiv\text{C}$ v), 1731 ($\text{C}=\text{O}$ ester et cétone v), 1608 ($\text{C}=\text{C}$ v), 1455 et 1388 (C-H δ), 1269 et 1159 (C-O ester v).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{O}_7$: 437, 1616, exp: 437, 1600.

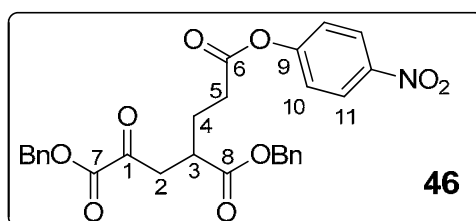
1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-(2,4,5-trichlorophényle) 45 ($\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{Cl}_3\text{O}_7$, 577,84 g/mol)



A une solution du composé **16** (1,06 g, 2,14 mmol) dans le CH₂Cl₂ (40 mL) sont ajoutés le 2,4,5-trichlorophénol (0,422 g, 2,14 mmol) puis le DMAP (26 mg, 0,21 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 30 minutes puis concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / CH₂Cl₂ : 7/3 puis 9/1). Le produit est isolé sous forme d'une huile incolore (0,353 g, **28,5 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,08 (2H, m, H⁴), 2,65 (2H, m, H⁵), 3,01 (1H, dd, J = 4,8 et 18,4 Hz, H^{2a}), 3,09 (1H, m, H³), 3,37 (1H, dd, J = 8,4 et 18,4 Hz, H^{2b}), 5,13 (2H, d, J = 1,2 Hz, OCH₂), 5,27 (2H, s, OCH₂Ph), 7,37 (12H, m, Har).

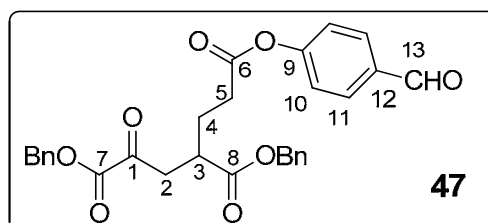
1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-(4-nitrophényle) 46 (C₂₈H₂₅NO₉, 519,50 g/mol)



A une solution du composé **16** (0,522 g, 1,07 mmol) dans le CH₂Cl₂ (25 mL) sont ajoutés le 4-nitrophénol (0,149 g, 1,07 mmol) puis le DMAP (13 mg, 0,107 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 45 minutes puis concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 3/7). Le produit est isolé sous forme d'une huile incolore (0,438 g, **78 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,05 (2H, m, H⁴), 2,65 (2H, m, H⁵), 3,03 (1H, dd, J = 5,2 et 18 Hz, H^{2a}), 3,1 (1H, m, H³), 3,38 (1H, dd, J = 8 et 18,4 Hz, H^{2a}), 5,13 (2H, s, J = 1,2 Hz, OCH₂), 5,27 (2H, s, OCH₂), 7,2 (2H, d, J = 9,2 Hz, H¹⁰), 7,36 (10H, m, Har), 7,24 (2H, d, J = 8,8 Hz, H¹¹).

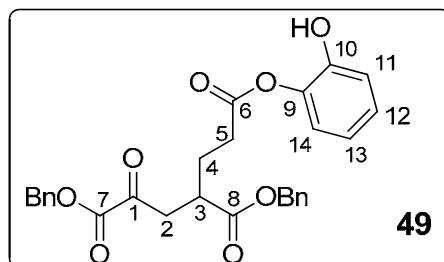
1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-(4-formylphényle) 47 (C₂₉H₂₆O₈, 502,51 g/mol)



A une solution du composé **16** (0,522 g, 1,07 mmol) dans le CH₂Cl₂ (25 mL) sont ajoutés le benzaldéhyde (0,130 g, 1,07 mmol) puis le DMAP (13 mg, 0,107 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 45 minutes puis concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 4/6). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,351 g, **65 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,06 (2H, m, H^4), 2,63 (2H, m, H^5), 3,03 (1H, dd, $J = 5,2$ et $18,8$ Hz, H^{2a}), 3,1 (1H, m, H^3), 3,38 (1H, dd, $J = 8,4$ et $18,4$ Hz, H^{2a}), 5,13 (2H, d, $J = 1,2$ Hz, OCH_2), 5,27 (2H, s, OCH_2Ph), 7,22 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, H^{10}), 7,36 (10H, m, Har), 7,9 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H^{11}), 7,98 (1H, s, H^{13}).

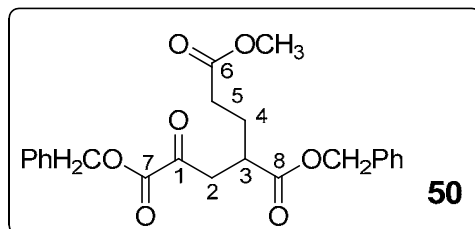
1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-(2-hydroxyphényle) 49 ($\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{O}_8$, 490,50 g/mol)



A une solution du composé **16** (0,534 g, 1,145 mmol) dans le CH_2Cl_2 (25 mL) sont ajoutés le pyrocatechol (0,152 g, 1,374 mmol) puis le DMAP (14 mg, 0,115 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 30 minutes puis concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : Pentane / Et_2O : 5/5). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,296 g, **53 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,04 (2H, m, H^4), 2,64 (2H, m, H^5), 3 (1H, dd, $J = 4,4$ et $18,4$ Hz, H^{2a}), 3,08 (1H, m, H^3), 3,36 (1H, dd, $J = 8,8$ et $18,4$ Hz, H^{2b}), 5,11 (2H, s, OCH_2), 5,24 (2H, s, OCH_2), 6,45 (1H, s, OH), 6,86 (1H, t, $J = 7,6$ Hz, H^{11}), 6,98 (2H, t, $J = 8,8$ Hz, H^{12} et H^{13}), 7,09 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, H^{14}), 7,34 (10H, m, H^{ar}).

1-oxopentane-1,3,5-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle et 5-méthyle 50 ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7$, 412,43 g/mol)



A une solution du composé **16** (1,12 g, 2,25 mmol) dans le CH_2Cl_2 (15 mL) sont ajoutés le MeOH (0,11 mL, 2,7 mmol) puis le DMAP (27 mg, 0,22 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 10 minutes puis lavé avec une solution de KHSO_4 0,5 M (10 mL) et H_2O (10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / ACOEt : 6/4). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,713 g, **76 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,85–2,02 (2H, m, H^4), 2,34 (2H, m, H^5), 2,92–3,05 (2H, m, H^{2a} et H^3), 3,34 (1H, dd, $J = 8,4$ et $18,1$ Hz, H^{2b}), 3,63 (3H, s, OCH_3), 5,13 (2H, s, OCH_2), 5,28 (2H, s, OCH_2), 7,38 (10H, m, Har).

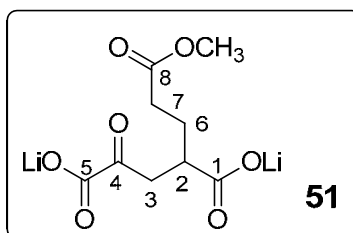
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 26,8 (C^4), 31,3 (C^5), 39,2 (C^3), 40,8 (C^2), 51,7 (OCH_3), 66,9 et 68,1 (OCH_2Ph), 128,2, 128,3, 128,6, 128,70, 128,73 et 128,8 (CHar), 134,3 et 135,5 (Car), 160,1 (C^7), 172,9 et 173,6 (C^6 et C^8), 191,7 (C^1).

IR (film, cm^{-1}) : 3033 et 2953 (C-H ν), 1735 (C=O ν), 1454 et 1371 (C-H δ), 1268, 1215 et 1167 (C-O ν), 749 et 697 (C-Har δ).

SM (ES+) calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{Na}$: 435,1420, exp : 435,1423.

Analyse élémentaire : calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7$ (%) C : 66,98, H : 5,86
trouvé (%) C : 66,97, H : 6,11.

Acide 2-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 51 ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_7\text{Li}_2$, 244,05 g/mol)



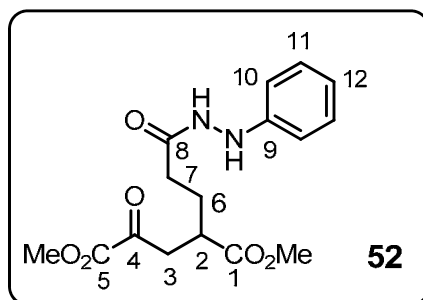
A une solution de produit **50** (0,300 g, 0,73 mmol) dans le MeOH (17 mL), est additionné du Pd/C à 10 % (0,059 g). Le milieu réactionnel est agité pendant 20 min à température ambiante sous une atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Après filtration sur membrane (millipore 0,22 μm) et évaporation du solvant, le résidu est repris dans H_2O (10 mL). Le pH de la solution est ajusté à 7,6 par addition d'une solution de LiOH à 0,4 M. Après évaporation de l'eau, le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,178 g, quantitatif).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,72 (2H, m, H^6), 2,38 (2H, m, H^7), 2,65 (1H, m, H^2), 2,85 (1H, dd, $J = 5,2$ et $18,4$ Hz, H^{3a}), 3,05 (1H, dd, $J = 8,8$ et $18,4$ Hz, H^{3b}), 3,69 (3H, s, OCH_3).

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ 27,1 (C^6), 31,7 (C^7), 41,9 (C^3), 42,3 (C^2), 51,4 (OCH_3), 169,6 (C^5), 176,6 (C^8), 182,5 (C^1), 204,7 (C^4).

SM (ES-) m/z calculé pour $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_7$: 231,0505 , exp : 231,0514.

2-(3- (2-phenylhydrazinyl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 52 ($\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ 336,34 g/mol)



A une solution du composé **14** (1,66 g, 4,8 mmol) dans CH_2Cl_2 (40 mL), est ajoutée la phénylhydrazine (0,85 mL, 8,64 mmol) puis le milieu est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec une solution de KHSO_4 0,5 M (20 mL) et avec H_2O (20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 5/5 puis 3/7). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,932 g, **58 %**).

On observe par RMN la présence de deux rotamères dans un rapport 87/13 dans le DMSO et 72/28 dans le CDCl_3 .

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,81 (2H, m, H^6), 2,22 (2H, m, H^7), 2,85 (2H, m, H^2), 3,03 (1H, dd, $J = 4,5$ et $18,9$ Hz, H^{3a}), 3,19 (1H, dd, $J = 9,2$ et $18,9$ Hz, H^{3b}), 3,6 (3H, s, OCH_3), 3,77 (3H, s, OCH_3), 6,67 (3H, m, H^{12} et H^{10}), 7,16 (2H, m, H^{11}), 7,59 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, CONHNH isomère majoritaire), 7,84 (1H, s, CONHNH isomère minoritaire), 8,9 (1H, s, CONH, isomère minoritaire), 9,6 (1H, d, $J = 1,4$ Hz, CONH, isomère majoritaire).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,93 (2H, m, H^6), 2,16 (2H, m, H^7 , isomère majoritaire), et 2,44 (2H, m, H^7 , isomère minoritaire), 2,88 (2H, m, H^2 et H^{3a}), 3,25 (1H, m, H^{3b}), 3,55 (3H, s, OCH_3 , isomère minoritaire), 3,65 (3H, s, OCH_3 , isomère majoritaire), 3,81 (3H, s, OCH_3 , isomère minoritaire), 3,82 (3H, s, OCH_3 isomère majoritaire), 4,98, (1H, s, élargi, CONHNH, isomère majoritaire), 5,96 (1H, s, élargi, CONHNH, isomère minoritaire), 6,68 (2H, d, $J = \text{H}^{10}$, isomère minoritaire), 6,76 (2H, d, $J = 8,28$ H^{10} , isomère majoritaire), 6,8 (1H, m, H^{12}), 7,18 (1H, m, H^{11}), 7,37 (1H, s, CONH, isomère minoritaire), 8,12 (1H, s, CONH, isomère majoritaire).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 26,89 (C^6), 30,56 (C^7), 38,78 (C^2), 38,91 (C^3), 52,31, 51,72, et 51,81 (OCH_3), 52,28 et 52,69 (OCH_3), 111,74 et 112,03 (C^{10}), 118,37 et 118,89 (C^{12}), 128,64 et 128,98 (C^{11}), 149,31 (C^9), 160,43 (C^5), 171,07 (C^8), 174,29 (C^1), 191,9 (C^4).

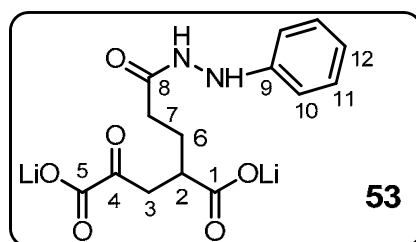
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 26,32 et 27,03, (C^6), 28,42 et 31,39 (C^7), 39,25 et 39,32 (C^2), 40,79 et 40,89 (C^3), 52,09 et 52,24 (OCH_3), 53,14 et 53,18 (OCH_3), 112,54 et 113,49 (C^{10}), 121,09 et 121,17 (C^{12}), 129,22 et 128,48 (C^{11}), 147,18 et 147,98 (C^9), 160,43 (C^5), 172,25 et 174,45 (C^8), 174,45 et 178,03 (C^1), 191,95 et 192,03 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 3434 (N-H v), 3351 (C-H ar v), 2945 (C-H alk v), 1731 (C=O ester et cétone v), 1698 et 1608 (C=O v), 1496 et 1392 (C-H δ), 1269 et 1172 (C-O ester v).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$: 359, 1201, exp: 359, 1219.

Analyses élémentaires calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 0,25 \text{H}_2\text{O}$ (%) C : 56,38, H : 6,06, N : 8,22
trouvé (%) C : 56,60, H : 6,01, N : 8,22.

2-(3-phénylhydrazinyl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 53 ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{Li}_2\text{N}_2\text{O}_6$, 320,15 g/mol)

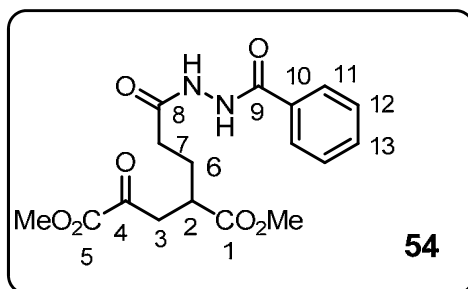


L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 52 (0,537 g 1,59 mmol) a été réalisée suivant le protocole décrit précédemment pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,511 g, quantitatif).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 1,86 (2H, m, H^6), 2,39 (4H, m, H^7), 2,69 (1H, m, H^2), 2,92 (1H, dd, $J = 5,6$ et $18,5$ Hz, H^{3a}), 3,09 (1H, dd, $J = 8,5$ et $18,5$ Hz, H^{3b}), 6,9 (2H d, $J = 6,7$ Hz, H^{11}), 6,99 (1H t, $J = 6,4$ Hz, H^{12}), 7,33 (2H t, $J = 7,2$ Hz, H^{10}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ 28,18 (C^6), 31,78 (C^7), 40,85 (C^3), 42,01 (C^2), 112,61, 121,15 et 129,26 (CH^{ar}), 147,25 (C^{ar}), 169,83 (C^5), 176,08 (C^8), 182,52 (C^1), 204,3 (C^4).

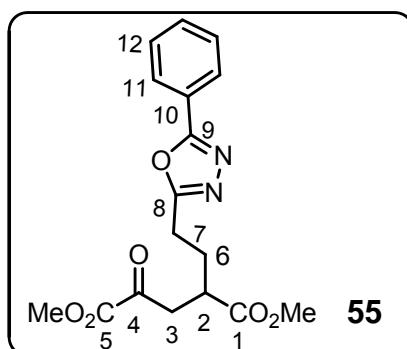
SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{LiN}_2\text{O}_6$: 315, 1170, exp: 315, 1168.

2-(3-(2-benzoylhydrazinyl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 54 (C₁₇H₂₀N₂O₇, 364,35 g/mol)

A une solution du composé **14** (0,561 g, 1,62 mmol) dans le CH₂Cl₂ (15 mL), est ajouté la benzohydrazide (0,253 g, 1,86 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution de KHSO₄ 0,5 M (10 mL) et avec H₂O (10 mL). La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 5/5 puis 3/7). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0,254 g, **43 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,79 (1H, m, H^{6a}), 1,94 (1H, m, H^{6b}), 2,32 (2H, m, H⁷), 2,86 (2H, m, H² et H^{3a}), 3,21 (1H, dd, J = 10,2 et 19,8 Hz, H^{3b}), 3,56 (3H, s, OCH₃), 3,78 (3H, s, OCH₃), 7,29 (H, t, J = 7,8 Hz, H¹²), 7,41 (1H, t, J = 7,4 Hz, H¹³), 7,76 (H, d, J = 13,8 Hz, H¹¹), 9,88 (1H, d, J = 4 Hz, NH), 10,21 (1H, d, J = 4 Hz, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25,96 (C⁶), 26,90 (C⁷), 39,11 (C²), 39,44 (C³), 52,08 (OCH₃), 53,02 (OCH₃), 127,45 (C¹¹), 128,55 (C¹²), 131,13 (C¹⁰), 132,30 (C¹³), 160,71 (C⁵), 165,37 (C⁹), 170,74 (C⁸), 174,32 (C¹), 191,87 (C⁴).

2-(2-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)éthyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 55 (C₁₇H₁₈N₂O₆, 346,33 g/mol)

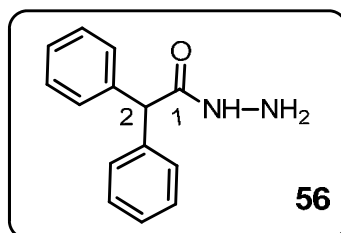
Le composé **54** (0,127 g, 0,35 mmol) est dissous dans CH₂Cl₂ anhydre (10 mL). Après refroidissement du milieu à 0°C, on ajoute CBr₄ (0,464 g, 1,4 mmol) et PPh₃ (0,367 g, 1,4 mmol). Le milieu est agité à 0°C pendant 30 minutes. Le milieu est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 8/2 puis 5/5). Le produit est isolé sous la forme d'une d'huile pateuse incolore (0,062 g, **51 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,10 (1H, m, H^{6a}), 2,22 (1H, m, H^{6b}), 3,00 (4H, m, H^7 , H^4 , et H^{3a}), 3,34 (1H, m, H^{3b}), 3,65 (3H, s, OCH_3), 3,82 (3H, s, OCH_3), 7,46 (3H m, H^{12} et H^{13}), 7,98 (2H, m, H^{11}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 23,25 (C^6), 27,99 (C^7), 39,08 (C^4), 40,67 (C^3), 52,30 (OCH_3), 53,16 (OCH_3), 123,82 (C^{10}), 126,79 (C^{11}), 129,05 (C^{12}), 131,68 (C^{13}), 160,72 (C^1), 164,94 et 165,64 (C^9 et C^8), 173,92 (C^5), 191,58 (C^2).

SM (ES $^+$) m/z calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_6$: 347, 33, exp: 347, 1243.

2,2-diphénylacétylhydrazide 56 ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ 226,27 g/mol)

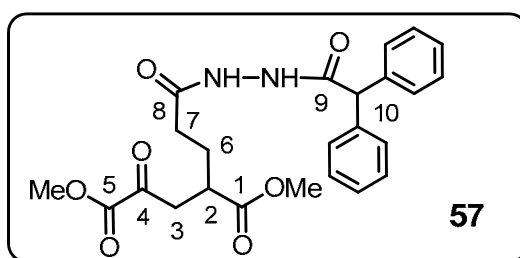


A une suspension d'hydrate d'hydrazine à 50 % (0,160 g, 5 mmol), dans CH_2Cl_2 anhydre (50 mL), refroidie à -70°C est ajoutée goutte à goutte et avec forte agitation une solution de chlorure de diphénylacétyl (0,230 g, 1 mmol) dans CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) pendant 3 h. Après réchauffement à température ambiante, le milieu est ensuite filtré sur célite puis séché sur MgSO_4 . Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,118 g, **52 %**).

RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 4,30 (2H, d, $J = 4$ Hz, NH_2), 4,8 (1H, s, H^2), 5,77 (10H, m, H^{ar}), 9,46 (1H, s, NH).

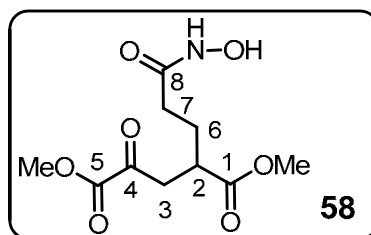
SM (ES $^+$) m/z calc pour $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$: 227, 1187, exp: 227, 1184.

2-(3-(2-(2,2-diphénylacétyl)hydrazinyl)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 57 ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$, 454,47g/mol)



A une solution du composé **14** (0,600 g, 1,73 mmol) dans le CH_2Cl_2 (25 mL) est ajouté le composé **56** (0,391 g, 1,73 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (9 mL) pendant 15 min. Le milieu est agité à température ambiante pendant une nuit. Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH_2Cl_2 / AcOEt : 5/5) et le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,42 g, **52 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,82 (1H, m, H^{6a}), 1,93 (1H, m, H^{6b}), 2,2 (1H, m, H^7), 2,88 (2H, m, H^2 et H^{3a}), 3,28 (1H, dd, $J = 10,4$ et 20 Hz, H^{3b}), 3,57 (3H, s, OCH_3), 3,76 (3H, s, OCH_3), 4,98 (1H, H^{10}), 7,25(10H, H^{ar}), 9,6 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, NH), 9,72 (2H, d, $J = 5,2$ Hz, NH).

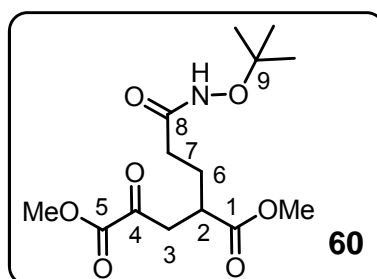
2-(3-(hydroxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 58 (C₁₀H₁₅NO₇, 261,23 g/mol)

A une solution du composé **14** (0,209 g, 0,604 mmol) dans le CH₂Cl₂, est ajoutée une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (46 mg, 0,664 mmol) et de DIEA (0,115 mL, 0,664 mmol) dans le DMSO (0,350 mL). Le milieu est agité à température ambiante pendant 5 min. Le milieu est concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH : 95/5 puis 85/15). Le produit est isolé sous la forme d'une huile orange visqueuse (0,083 g, **52 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,88 (2H, m, H⁶), 2,22 (2H, m, H⁷), 2,93 (2H, m, H² et H^{3a}), 3,25 (1H, dd, J = 8,4 et 18,4 Hz, H^{3b}), 3,64 (3H, s, OCH₃), 3,84 (3H, s, OCH₃), 6,14 (1H, s élargi, OH), 9,93 (1H, s élargi, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 27,09 (C⁶), 30,16 (C⁷), 39,26 (C²), 40,74 (C³), 52,23 (OCH₃), 53,23 (OCH₃), 160,87 (C⁵), 170,73 (C⁸), 174,7 (C¹), 192,14 (C⁴).

SM (ES⁺) m/z calculé pour C₁₀H₁₅NO₇Na: 284,0764 exp: 284, 0746.

2-(3-(tert-butoxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 60 (C₁₄H₂₃NO₇, 317,33 g/mol)

Le chlorure de O-tert-butylhydroxylammonium (0,387 g, 3,08 mmol), est dissous dans H₂O (10 mL) puis le pH est ajusté à 9 avec une solution de NaOH (1M). Le précipité formé est extrait avec CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite (346 mbar). Le produit est ensuite ajouté à une solution du composé **14** (0,921 g, 2,66 mmol) dans le CH₂Cl₂ (35 mL). Le milieu est agité à température ambiante pendant 3 heures. Le milieu est ensuite concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 4/6, 3/7). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0.5 g, **59 %**).

On observe par RMN la présence des deux rotamères dans un rapport 64/36.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,25 (9H, s, CH₃), 1,95 (2H, m, H⁶), 2,17 (2H, m, H⁷, isomère majoritaire), 2,47 (2H, m, H⁷, isomère minoritaire), 2,95 (1H, m, H² et H^{3a}), 3,31

(1H, dd, $J = 10,2$ et $19,6$ Hz, H^{3b}), 3,67 (3H, s, OCH₃), 3,86 (3H, s, OCH₃), 8,88 (1H, s élargi, NH), 8,04 (1H, s élargi, NH).

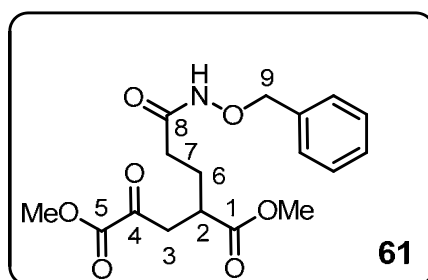
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) δ 26,31 (CH₃), 27,30 (C⁶), 29,01 (C⁷ isomère minoritaire), et 30,67 (C⁷, isomère majoritaire), 39,26 (C⁴), 40,97 (C³), 52,24 (OCH₃), 53,19 (OCH₃), 82,02 (C⁹), 160,83 (C⁵), 170,91 (C⁸), 174,44 (C¹), 191,92 (C⁴).

IR (film, cm⁻¹) : 3200 (N-H ν), 2978 (C-H alk ν), 1732 (C=O ester et cétone ν), 1664 (C=O hydroxamate ν), 1519 (N-H et C-H ar δ), 1437 (C-H δ), 1263 et 1186 (C-O ester ν), 1062 (C-H ar δ).

SM (ES⁺) m/z calculé pour C₁₄H₂₄NO₇: 318, 1553, exp: 318, 1553.

Analyses élémentaires calculé pour C₁₄H₂₃NO₇ 0,25 H₂O (%) C : 52,25 H : 7,36, N : 4,35
trouvé (%) C : 52,29, H : 7,41, N : 4,42

2-(3-(benzyloxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 61 (C₁₇H₂₁NO₇ 351,35 g/mol)



La O-benzylhydroxylamine (0,672 g, 4,23 mmol) est dissoute dans H₂O (11 mL) puis le pH est ajusté à 9 avec solution du NaOH (1M). Le précipité formé est extrait avec du CH₂Cl₂ (2 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le produit est ensuite ajouté à une solution du composé **14** (1,33 g, 3,85 mmol) dans le CH₂Cl₂ (35 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 10 minutes. Le milieu est concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant: CH₂Cl₂ / MeOH : 98/2) et isolé sous la forme d'une huile incolore (0,774 g, **59 %**).

On observe par RMN la présence des deux rotamères dans un rapport 73/27.

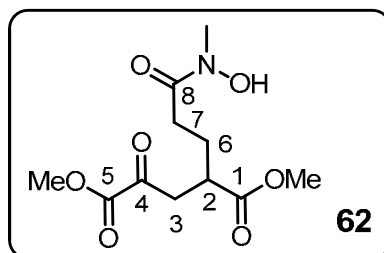
RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,92 (2H, m, H^6), 2,1 (2H, m, H^7 , isomère majoritaire) 2,39 (2H, m, H^7 isomère minoritaire), 2,91 (1H, m, H^2 et H^{3a}), 3,28 (1H, dd, $J = 10$ et $19,2$ Hz, H^{3b}), 3,64 (3H, s, OCH₃), 3,86 (3H, s, OCH₃), 4,89 (2H, m, H^9), 7,37 (5H, m, H^{ar}), 8,022 et 8,39 (1H, s élargi, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) δ 27,05 (C⁶), 30,49 (C⁷), 39,22 (C²), 40,96 (C³), 52,26 (OCH₃), 53,19 et 53,56 (OCH₃), 78,29 (C⁹), 128,76, 129,04 129,15 et 129,32 (CH^{ar}), 135,40 (C^{ar}), 160,86 (C⁵), 169,53 (C⁸), 174,32 (C¹), 191,87 (C⁴).

IR (film, cm⁻¹) : 3221 (N-H ν), 2955 (C-H alk ν), 1732 (C=O ester et cétone ν), 1666 (C=O ν), 1496 (N-H et C-H ar δ), 1437 (C-H δ), 1263 et 1213 (C-O ester ν), 1062 (C-H ar δ).

SM (ES⁺) m/z calculé pour C₁₇H₂₂NO₇: 352, 1388, exp: 352, 1396.

Analyses élémentaires calculé pour C₁₇H₂₁NO₇ 0,5 H₂O C : 56,66, H : 6,15, N : 3,89.
trouvé (%) C : 56,68, H : 6,14, N : 4,03.

2-(3-(hydroxy(méthyl)amino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 62 (C₁₁H₁₇NO₇ 275,26) g/mol

A une solution du composé **14** (1,66 g, 4,79 mmol) dans le CH₂Cl₂ (40 mL), est ajoutée une solution de N-méthylhydroxylamine (0,441 g, 5,28 mmol) et de DIEA (0,915 mL, 5,28 mmol) dans le DMSO (2,85 mL). Le milieu est agité à température ambiante pendant 5 min. Le milieu est ensuite concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt: 2/8 puis AcOEt puis AcOEt / MeOH : 9/1). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,672 g, **52 %**).

On observe par RMN la présence des deux rotamères dans un rapport 60/40.

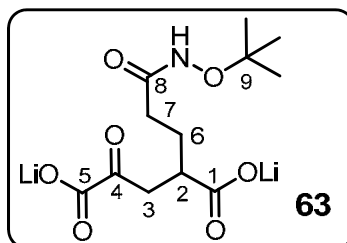
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,93 (2H, m, H⁶), 2,37 et 2,5 (2H, m, H⁷), 2,91 (2H, m, H² et H^{3a}), 3,29 (4H, m, CH₃ et H^{3b}), 3,65 (3H, s, OCH₃), 3,86 (3H, s, OCH₃), 8,41 (1H, s élargi OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 26,59 (C⁶), 28,65 et 29,40 (C⁷), 36,19 (CH₃), 39,23 et 39,50 (C²), 40,89 (C³), 52,29 (OCH₃), 53,23 (OCH₃), 160,86 (C⁵), 166,25 (C⁵), 173,46 (C⁸), 174,27 et 174,88 (C¹), 191,76 et 192,06 (C⁴).

IR (film, cm⁻¹) : 3266 (O-H ν), 2955 (C-H alk ν), 1727 (C=O ester et cétone ν), 1624 (C=O hydroxamate ν), 1438 (C-H δ), 1273 et 1174 (C-O ester ν), 1075 (C-H ar δ).

SM (ES+) m/z calculé pour C₁₁H₁₈NO₇: 276, 1069, exp: 276, 1083.

Analyses élémentaires calculé pour C₁₆H₁₉NO₆ (%) C : 47,53, H : 6,23, N: 5,09
trouvé (%) C : 47,53, H : 6,18, N:5,07

2-(3-(tert-butoxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 63 (C₁₂H₁₇Li₂NO₇, 301,15) g/mol

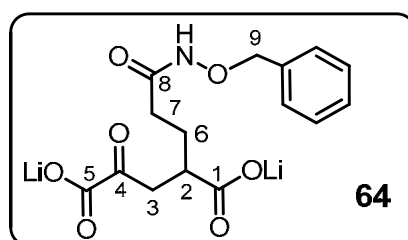
L'hydrolyse des esters méthyliques du composé **60** (0,4 g, 1,26 mmol) a été réalisée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **30**. Le produit est isolé sous la forme d'un solide bleu (0,367 g, quantitatif).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 1,52 (9H, s, CH_3), 1,76 (1H, m, H^6), 2,22 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, H^7), 2,65 (1H, m, H^2), 2,86 (1H, dd, $J = 5,6$ et $18,4$ Hz, H^{3a}), 3,05 (1H, dd, $J = 8,4$ et $18,4$ Hz, H^{3b}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ 25,35 (CH_3), 28,18 (C^6), 30,64 (C^7), 41,85 (C^3), 42,54 (C^2), 83,87 (C^9), 169,82 (C^5), 173,38 (C^8), 182,39 (C^1), 204,28 (C^4).

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_7$: 290, 1244, exp: 290, 1240.

2-(3-(benzyloxyamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 64 ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{Li}_2\text{NO}_7$, 335,16) g/mol



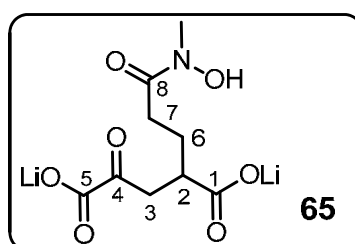
L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 61 (0,634 g, 1,8 mmol) a été réalisée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,594 g, quantitatif)

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 1,68 (1H, m, H^6), 2,09 (2H, t, $J = 8$ Hz, H^7), 2,56 (1H, m, H^2), 2,79 (1H, dd, $J = 5,6$ et $18,4$ Hz, H^{3b}), 2,98 (1H, dd, $J = 7,2$ et 18 Hz, H^{3a}), 4,88 (2H, s, H^{10}), 7,44 (5H, s, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ 27,97 (C^6), 30,43 (C^7), 41,72 (C^3), 43,33 (C^2), 78,18 (C^9), 128,68, 129,18, 129,83 (CH^{ar}), 134,56 (C^{ar}), 169,75 (C^1), 172,09 (C^8), 182,39 (C^5), 204,66 (C^4).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{Li}_2\text{NO}_7\text{Na}$: 346 0905, exp: 346, 0903.

2-(3-(hydroxy(methyl)amino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 65 ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Li}_2\text{NO}_7$, 259,07 g/mol)



L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 62 (0,430 g, 1,66 mmol) a été réalisée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,400 g, quantitatif).

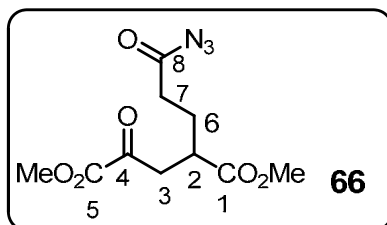
On observe par RMN la présence des deux rotamères dans un rapport 74/26.

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 1,77 (1H, m, H^{6a}), 2,40, et 2,52 (2H, m, H^7), 2,66 (1H, m, H^4), 2,87 (1H, dd, $J = 5,6$ et $18,4$ Hz, H^{3a}), 3,04 (1H, m, H^{3a}), 3,22, et 3,34 (3H, s, CH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ 27,45 (C^6), 29,63 et 30,38 (C^7), 35,92 (CH_3), 41,95 (C^3), 42,57 (C^2), 169,95 (C^5), 175,68 (C^8), 182,70 (C^5).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{LiNO}_7$: 254, 0863, exp: 254, 0852

2-(3-azido-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 66 ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6$, 271,23 g/mol)



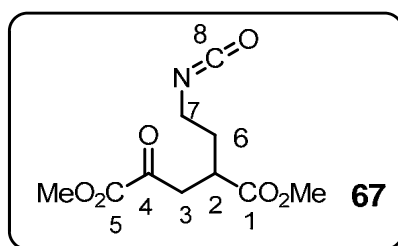
Le composé **14** (1,10 g 3,18 mmol) est dissous dans le THF (15 mL) et la solution est refroidie à -10°C . Une solution de NaN_3 (0,191 g, 3,18 mmol) dans H_2O (1 mL) est ensuite ajoutée et le milieu réactionnel est agité à -10°C pendant 15 minutes puis à température ambiante pendant 1 heure. Le milieu est dilué avec AcOEt (40 mL), séché sur MgSO_4 et concentré sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,81 g, **94 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,90 (2H, m, H^6), 2,43 (2H, m, H^7), 2,96 (2H, m, H^4 et H^{3a}), 3,31 (1H, m, H^{3b}), 3,68 (3H, s, OCH_3), 3,87 (3H, s, OCH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 26,15 (C^6), 29,31 (C^7), 38,87 (C^2), 40,73 (C^3), 52,20 (OCH_3), 53,15 (OCH_3), 160,74 (C^5), 173,98 (C^1), 179,46 (C^8), 191,57 (C^4).

IR (film, cm^{-1}): 2956 (C-H alk ν), 2141 (C- N_3 ν), 1731 (C=O ester et cétone ν), 1438 et 1358 (C-H δ), 1269 et 1172 (C-O ester ν).

2-(2-isocyanatoéthyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 67 ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_6$, 243,21 g/mol)



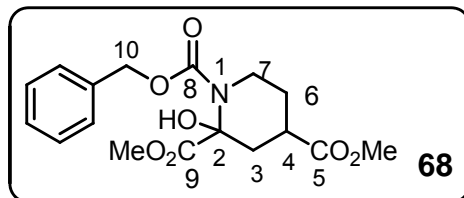
Le composé **66** est dissous dans CH_2Cl_2 anhydre (10 mL) et la solution est chauffée à 40°C pendant 24 h. Le solvant est ensuite évaporé. Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0,537 g, quantitatif).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,81 (1H, m, H^{6a}), 1,98 (1H, m, H^{6b}), 3,01 (2H, m, H^2 et H^{3a}), 3,31 (1H, dd, $J = 7,9$ et 18 Hz, H^{3b}), 3,42 (2H, t, $J = 6,7$ Hz), 3,69 (3H, s, OCH_3), 3,87 (3H, s, OCH_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 26,26 (C^6), 38,99 (C^2), 40,59 (C^3), 40,84 (C^7), 52,43 (OCH_3), 53,29 (OCH_3), 122,42 (C^8), 160,85 (C^5), 174,06 (C^1), 191,97 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 2956 (C-H alk v), 2273 (C=N=O v), 1731 (C=O ester et cétone v), 1438 et 1358 (C-H δ), 1269 et 1172 (C-O ester v).

2-hydroxypipéridine-1,2,4-tricarboxylate de 1-benzyle et 2,4-diméthyle 68 ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_7$ 351,35 g/mol)



A une solution de l'isocyanate 67 (0,1 g, 0,41 mmol) dans le toluène (60 mL), est ajouté l'alcool benzylique (0,042 ml, 0,41 mmol). Le milieu est agité à 80 °C pendant 3 jours. La disparition de l'isocyanate est suivie par IR. Le milieu est concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 8/3). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0,059 g, 45 %).

On observe par RMN la présence des deux isomères cycliques.

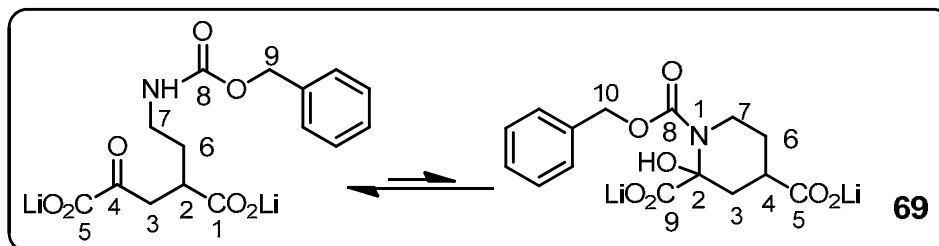
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,77 (1H, m, H^{6a}), 2,04 (3H, m, H^{6b} et H^3), 2,25 (1H, m, H^3), 2,69 (2H, m, H^4 isomère minoritaire), 2,86 (2H, m, H^4 isomère majoritaire), 3,3 (1H, m, H^{7a} isomère majoritaire), 3,5 (1H, m, H^{7a} isomère minoritaire), 3,68 (6H, s, OCH_3), 3,74 (1H, m, H^{7b} isomère minoritaire), 3,9 (1H, m, H^{7b} isomère majoritaire), 4,41 (1H, s élargi, OH), 5,1 (2H, m, H^{10}), 7,34 (5H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 25,16 (C^6 , isomère minoritaire), 26,68 (C^6 isomère majoritaire), 34,90 (C^4 isomère minoritaire), 35,18 (C^4 isomère majoritaire), 35,52 (C^3 isomère minoritaire), 37,28 (C^3 isomère majoritaire), 40,78 (C^7 , isomère minoritaire), 41,36 (C^7 isomère majoritaire), 52,13, 52,22, et 52,31 (OCH_3), 53,24 53,29 et 53,52 (OCH_3), 66,95, 67,89 et 68,03 (C^{10}), 82,24 (C^8), 128,27, et 128,46 et 128,66 160,85 (CH^{ar}), 135,75 (C^{ar}), 173,07 (C^9), 174,69 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 3450 (N-H et C-H ar v), 2923 (C-H alk v), 1731 (C=O ester v), 1633 (C=O v), 1454 et 1341 (C-H δ), 1260 et 1123 (C-O ester v).

SM (ES⁺) m/z calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_7\text{Na}$: 374, 1210, exp: 374, 1216.

2-(2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)ethyl)-4-oxoglutarate de dilithium 69 ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{Li}_2\text{NO}_7$, 335,16 g/mol)



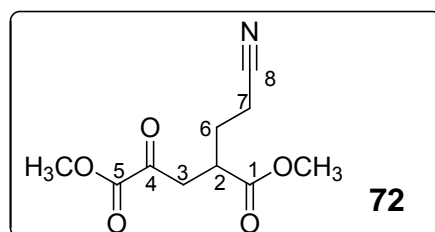
L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 68 (0,059 g, 0,187 mmol) a été réalisée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,055 g, 87 %).

La RMN du produit dans D₂O montre, en plus des deux isomères cycliques (C1 et C2) la présence de la forme linéaire (L) qui représente 68 %.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O): δ 1,66 (2H, m, H⁶, C1, C2 et L), 1,96 (1H, m, H³, C1 et C2), 1,98 (1H, m, H⁶, C1 et C2), 2,14 (1H, m, H³, C1 et C2), 2,49 (1H, m, H², C1 et C2), 2,64 (1H, m, H², L), 2,82 (1H, m, H^{3a}, L), 3,02 (1H, m, H^{3b}, L), 3,1 (2H, m, H⁷, f L), 3,21 (2H, m, H^{7a}, C1 et C2), 3,83 (1H, m, H^{7b}, C1 et C2), 5,06 (2H, s, H¹⁰, C1 et C2, H⁹, L), 5,1 (2H, s, H¹⁰, C1 et C2), 7,38 (5H, m, H^{ar}, C1, C2 et L).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O): δ 27,12 (C⁶, C1 et C2), 35,54 (C³, C1 et C2), 37,87 (C⁴, C1 et C2), 38,67 (C³, C1 et C2, C⁷, L), 40,68 (C⁴, L), 41,85 (C⁷, C1 et C2), 41,99 (C³, L), 66,77 (C¹⁰, C1 et C2, C⁹, L), 67,62 (C¹⁰, C1 et C2, C⁹, L), 84,25 (C², C1 et C2), 127,61, 127,68, 128,28, 128,66 et 128,75 (CH^{ar}), 158,45 et 158,25 (C^{ar}), 182,94 (C⁹, C1 et C2 et C⁵, L), 183,77 (C⁵, C1 et C2, C¹, L), 204,35 (C⁴, L).

2-(2-cyanoethyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 72 (C₁₀H₁₃NO₅, 227,21 g/mol)



A une solution de composé **17** (2,3 g, 9,38 mmol), dans le THF anhydre (25 mL) est ajoutée de la pyridine anhydre (1,52 mL, 18,76 mmol). Après refroidissement du milieu à 0°C, l'anhydride trifluoacétique (1,44 mL, 10,32 mmol) est alors ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité à 0°C pendant 20 minutes puis à température ambiante pendant 2 h. Une solution aqueuse de NaCl saturée (15 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (2 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 5/5). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (1,84 g, **87 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,92 (1H, m, H^{6a}), 2,06 (1H, m, H^{6b}), 2,47 (2H, t, J = 6,8 Hz, H⁷), 3,02 (2H, m, H^{3a} et H²), 3,36 (1H, m, H^{3b}), 3,7 et 3,88 (3H, s, OCH₃).

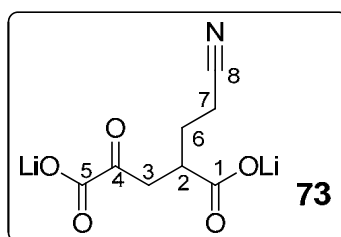
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 15,42 (C⁷), 27,42 (C⁶), 38,83 (C²), 40,54 (C³), 52,56 et 53,36 (OCH₃), 118,75 (C⁸), 160,69 (C⁵), 173,33 (C¹), 191,9 (C⁴).

IR (film, cm⁻¹) : 2957 (C-H alk v), 2220 (CN v), 1731 (C=O ester v), 1437 (C-H δ), 1262 et 1172 (C-O ester v).

SM (ES+) m/z calculé pour C₁₀H₁₃NO₅Na : 250,0698, exp : 250,0691.

Analyses élémentaires : calculé pour C₁₀H₁₃NO₅ C : 52,86, H : 5,77, N : 6,16.

trouvé (%) C : 52,89, H : 5,77, N : 6,39.

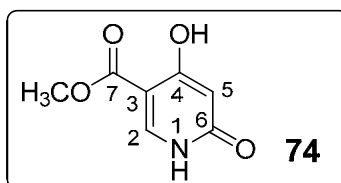
2-(2-cyanoethyl)-4-oxoglutarate de dilithium 73 (C₈H₇Li₂NO₅, 211,03 g/mol)

L'hydrolyse des esters méthyliques du composé 72 (0,2 g, 0,88 mmol) a été réalisée suivant le protocole précédemment décrit pour le composé 30. Le produit est isolé sous la forme d'un solide orange (0,186 g, quantitatif).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,73 (2H, m, H⁶), 2,37 (2H, m, H⁷), 2,59 (1H, m, H²), 2,77 (1H, dd, J = 5,6 et 18,8 Hz, H^{3a}), 2,95 (1H, dd, J = 8,4 et 18,8 Hz, H^{3b}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 14,76 (C⁷), 27,48 (C⁶), 41,73 (C³), 42,23 (C²), 121,22 (C⁸), 169,53 (C⁵), 181,77 (C¹), 203,79 (C⁴).

SM (ES-) m/z calculé pour C₈H₈NO₅ : 198,0392, exp: 198,0402.

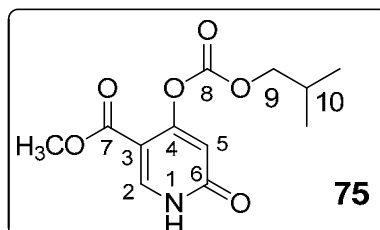
4-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate de méthyle 74 (C₇H₇NO₄, 169,13 g/mol)

Un mélange de 3-oxoglutarate de diméthyle (3,6 mL, 25 mmol), d'orthoformate de triéthyle (2,73 mL, 25 mmol) et d'anhydride acétique (4,69 mL, 50 mmol) est chauffé à 135°C pendant une heure. Le milieu est concentré sous pression réduite puis refroidi à 0°C. Une solution d'ammoniaque (4 mL, 62,5 mmol) est ajoutée goutte à goutte, le précipité formé est dissous par addition de H₂O (40 mL). Après agitation à température ambiante pendant une nuit le milieu est lavé avec AcOET (2 x 10 mL) puis la phase aqueuse est acidifiée avec une solution aqueuse d'HCl à 10%. Le précipité jaune pâle formé est ensuite filtré puis lavé avec H₂O (2 x 20 mL). Le solide est repris avec du toluène (75 mL) puis chauffé à reflux pendant une heure dans un montage deDean-Stark. Après évaporation du solvant le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune pâle (2,35 g, **55 %**).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3,77 (3H, s, OCH₃), 5,608 (1H, s, H⁵), 8,01 (1H, s, H²).

RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ 52,09, (OCH₃), 98,59 (C⁵), 100,34 (C³), 142,74 (C²), 163,67 (C⁶), 165,96 (C⁷), 166,27 (C⁴).

SM (ES+) m/z calculé pour C₇H₇NO₄Na : 192,0263 , exp : 192,0273.

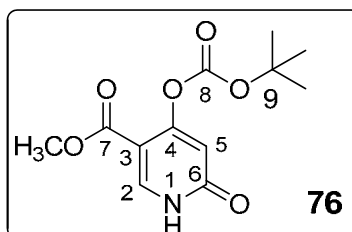
4-(isobutoxycarbonyloxy)-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate de méthyle 75
(C₁₂H₁₅NO₆, 269,25 g/mol)

A une solution de composé **74** (1 g, 5,9 mmol) dans le DMF (30 mL) est ajoutée de la triéthylamine (5,9 mmol, 0,82 mL) puis de l'IBCF (5,9 mmol, 0,78 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 30 min. Le milieu est dilué avec H₂O (100 mL) puis extrait avec AcOEt (4 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées puis lavées avec H₂O (25 mL), une solution aqueuse saturée de NaCl (25 mL), séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le produit **75** est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH: 95/5) et isolé sous la forme d'un solide jaune (1,03 g, **65 %**).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,00 (6H, d, J = 8 Hz, CH₃), 2,07 (1H, m, H¹⁰), 3,82 (3H, OCH₃), 4,06 (2H, d, J = 8 Hz, H⁹), 6,34 (1H, s, H⁵), 8,28 (1H, s, H²), 13,06 (1H, s élargi, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18,97 (CH₃), 27,84 (C¹⁰), 52,33 (OCH₃), 75,77 (C⁹), 106,75 (C³), 111,94 (C⁵), 141,95 (C⁸), 160,29, 162,50 et 166,50 (C², C⁷ et C⁴).

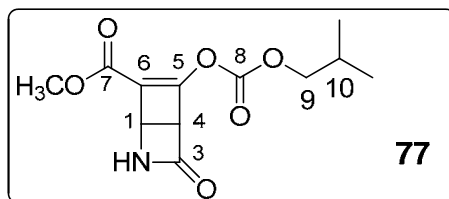
SM (ES⁺) m/z calculé pour C₁₂H₁₅NO₆Na : 292,0802 , exp : 292,0797.

4-(tert-butoxycarbonyloxy)-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate de méthyle 76
(C₁₂H₁₅NO₆, 269,25 g/mol)

A une solution de composé **74** (1 g, 5,9 mmol) dans le DMF (30 mL) est ajouté du DMAP (0,108 g, 0,88 mmol) et du BOC₂ (1,42 g, 6,5 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Le milieu est dilué avec H₂O (100 mL) puis extrait avec AcOEt (2 x 150 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH : 95/5). Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (1 g, **62 %**).

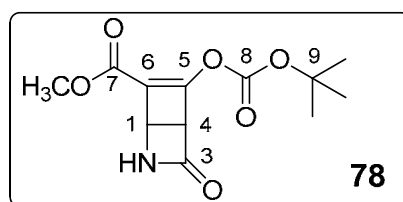
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,49 (9H, s, CH₃), 3,76 (3H, s, OCH₃), 6,26 (1H, s, H⁵), 8,22 (1H, s, H²), 13,12 (1H, s élargi, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 27,57 (CH₃), 52,16 (OCH₃), 84,87 (C⁹), 106,78 (C³), 111,73 (C⁵), 142,05 (C⁶), 149,74 (C⁸), 160,12, 162,49 et 166,33 (C², C⁷ et C⁴).

5-(isobutoxycarbonyloxy)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.0]hex-5-ène-6-carboxylate de méthyle 77 (C₁₂H₁₅NO₆, 269,25 g/mol)

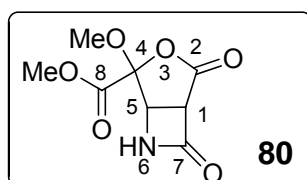
Une solution de composé 75 (0,41 g, 1,5 mmol), dans CH₂Cl₂ (300 mL) préalablement dégazé avec un flux d'argon est irradiée dans un réacteur en pyrex avec une lampe a Hg, moyenne pression de 400 W pendant 4 h. Le milieu est ensuite concentré sous pression réduite pour l'étape suivante.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,98 (6H, d, J = 6,8 Hz, CH₃), 2,04 (1H, m, H¹⁰), 3,78 (3H s, OCH₃), 4,08 (2H, d, J = 6,8 Hz, H⁹), 4,52 (1H, d, J = 2,4 Hz, H⁴), 4,74 (1H, m, H¹), 6,29 (1H, s élargi, NH).

5-(tert-butoxycarbonyloxy)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.0]hex-5-ène-6-carboxylate de méthyle 78 (C₁₂H₁₅NO₆, 269,25 g/mol)

Une solution de composé 76 (0,4 g, 1,49 mmol), dans CH₂Cl₂ (300 mL) préalablement dégazé avec un flux d'argon est irradiée dans un réacteur en pyrex avec une lampe a Hg, moyenne pression de 400 W pendant 7 h. Le milieu est ensuite concentré sous pression réduite et transvasé dans un ballon bicol pour l'étape suivante.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,54 (9H, s, CH₃), 3,77 (3H, s, OCH₃), 4,51 (1H, d, J = 2 Hz, H⁴), 4,71 (1H, d, J = 1,2 Hz, H¹), 6,1 (1H, s élargi, NH).

4-méthoxy-2,7-dioxo-3-oxa-6-azabicyclo[3.2.0]heptane-4-carboxylate de méthyle 80 (C₈H₉NO₆ 215,16 g/mol)

- Première méthode

La solution du composé 77 (1,5 mmol) dans CH₂Cl₂ (60 mL) est refroidie à -70°C puis saturée par un flux d'O₃ pendant environ 45 min jusqu'à ce qu'une coloration bleu du milieu

apparaisse. L'excès d'ozone est ensuite éliminé par un flux d'O₂ pur (disparition de la coloration bleu). Le sulfure de diméthyle (0,170 mL, 2,32 mmol), le MeOH (3,13 mL, 77,5 mmol) et le DMAP (0,019 g, 0,15 mmol) sont ensuite ajoutés. Le milieu est agité à température ambiante pendant une nuit puis concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 6/4) et isolé sous la forme d'un solide blanc (0,050 g, **15 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 3,59 (3H, s, OCH₃), 3,89 (3H, s OCH₃), 4,2 (1H, d, J = 4 Hz, H¹), 4,48 (1H, d, J = 3,6 Hz, H⁵).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) 53,87 (C⁵), 54,06 (OCH₃), 55,74 (OCH₃), 59,77 (C¹), 104,96 (C⁴), 161,88 (C⁷), 168,13 (C²), 168,39 (C⁸).

IR (KBr, cm⁻¹) : 3293 (N-H ν), 2953 (C-H alk ν), 1810 (C=O lactone ν) 1736 (C=O ester ν), 1740 (C=O lactame ν) 1454 (N-H et C-H ar δ), 1227 et 1160 (C-O ester ν).

SM (ES+) m/z calc pour C₈H₉NO₆Na : 238,0327, exp : 238,0328.

- Seconde méthode

La solution du composé **78** (1,5 mmol) dans CH₂Cl₂ (60 mL) est refroidie -70°C puis saturée par un flux d'O₃ pendant environ 45 min jusqu'à ce qu'une coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est ensuite éliminé par un flux d'O₂ pur (disparition de la coloration bleu). Le sulfure de diméthyle (0,150 mL, 2,06 mmol), le MeOH (0,083 mL, 2,06 mmol) et le DMAP (0,014 g, 0,137 mmol) sont ensuite ajoutés. Le milieu est agité à température ambiante pendant une nuit puis concentré sous pression réduite puis purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane / AcOEt : 6/4) et isolé sous la forme d'un solide blanc (0,082 g, **28 %**).

SYNTHESE DES ANALOGUES DE L'ACIDE GLUTAMIQUE

Protocole général de la réaction de transamination catalysée par l'AspAT d'*E.coli*

Le cétooglutarate (environ 1 mmol, 1 eq.) et l'ACS (1 eq.) afin d'avoir H₂O de telle sorte à avoir une concentration de 20 mM Le pH du milieu réactionnel est ajusté à 7,6 avec une solution aqueuse de KOH 1 M. La quantité d'AspAT (suspension à 250 UI/mL) permettent d'atteindre un taux de conversion de 45 % en 2-4h est centrifugée (3 min à 10 000 t/min). Le culot est ensuite dissous dans 1 mL de milieu réactionnel et la solution est additionnée au reste du milieu réactionnel. Au cours de la réaction, le cétoacide résiduel et l'acide pyruvique produit sont dosés à intervalle de temps réguliers.

Lorsque le taux de conversion est de 45 %, le milieu réactionnel est déposé sur une colonne de résine fortement acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H⁺ 10 mL / mmol de cétoacide). La résine est lavée abondamment à l'eau afin d'éliminer le cétoacide résiduel, l'excès d'ACS et l'acide pyruvique. Une élution avec une solution aqueuse de NH₃ 1M permet de décrocher le produit de la résine. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le résidu est ensuite repris dans un minimum d'eau et déposé sur une résine fortement basique (Dowex 1ou 2X8, 200-400 mesh, forme acétate, 10 mL / mmol de cétoacide). La colonne est éluee à l'eau puis avec un gradient d'AcOH (0,1 à 2M). Les fractions contenant le produit désiré sont rassemblées, évaporées sous pression réduite. Le résidu est dissous dans H₂O puis lyophilisé. L'acide aminé est isolé sous la forme d'un solide blanc avec un rendement compris entre 40 et 45 %.

Protocole général de purification des analogues du Glu hydrophobes sur la résine QAE Séphadex.

Après purification des produits sur la résine acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H⁺), le résidu est ensuite repris dans un minimum d'eau et déposé sur une résine basique de type QAE Sépare (forme HCO₂⁻, 10 ml / mmole de résine). La colonne est éluee à l'eau puis avec un gradient de bicarbonate d'ammonium (10mM à 1M). Les fractions contenant le produit désiré sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le résidu est ensuite dissous dans le volume minimum de solution aqueuse de bicarbonate d'ammonium 10 mM puis lyophilisé. L'acide aminé est isolé sous la forme d'un solide blanc avec un rendement global d'environ 45 %.

Protocole de dosage du cétoacide résiduel pour le suivi de la transamination

Dans une cuvette, sont introduits : 20 µl d'une solution de NADH (10 mg/mL), 10 µl d'une solution de MDH (200 UI/mL, 2UI), 10 µl d'une solution d'AAT (100 UI/mL, 1UI) et 955 µl de tampon Kpi, 100mM, pH 7,6 contenant 40 mM d'Asp Après avoir mesuré la DO initiale à 340 nm (DO_i), 5 µl de milieu réactionnel sont ajoutés dans la cuvette du spectrophotomètre. Après environ 300 secondes, la DO finale stabilisée (DO_f) est mesurée. La concentration en cétoacide restant dans le milieu est donnée par la formule suivante :

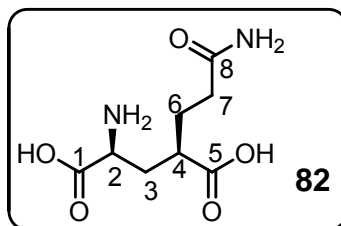
$$((DO_f - DO_i) / 6220) * 400$$

Protocole de dosage du pyruvate pour le suivi de la transamination

Dans une cuvette, sont introduits : 20 µl d'une solution de NADH (10 mg/mL), 20 µl d'une solution de LDH (200 UI/mL, 2UI) et 955 µl de tampon Kpi, 100mM, pH 7,6 contenant 40 mM d'Asp. Après avoir mesuré la DO initiale à 340 nm (DOi), 5 µl de milieu réactionnel sont ajoutés dans la cuvette du spectrophotomètre. Après environ 300 secondes, la DO finale stabilisée (notée DOf) est mesurée. La concentration en pyruvate produit lors de la transamination est alors donnée par la formule suivante :

$$((DOf-DOi)/6220)*200$$

Acide (2S,4R)-4-(3-amino-3-oxopropyl)glutamique 82 (C₈H₁₄O₅N₂, 218,21 g/mol)



RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,90 (2H, m, H⁶), 1,95 (1H, ddd, J = 4,6, 10,0 et 15,0 Hz, H^{3a}), 2,27 (1H, ddd, J = 5,3, 9,5 et 15,0 Hz, H^{3b}), 2,32 (2H, td, J = 2,5 et 6,5 Hz, H⁷), 2,62 (1H, m, H⁴), 3,78 (1H, dd, J = 5,4 et 8,3 Hz, H²)

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ : 27,8 (C⁶), 32,3 (C³ et C⁷), 41,6 (C⁴), 53,3 (C²), 173,6 (C⁸), 178,5 (C¹), 177,7 (C⁵).

PF = 120-125 °C

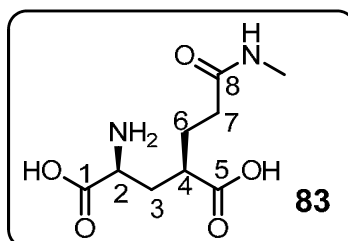
$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, HCl 6N) = + 34,2.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3427 et 3196 (N-H et O-H ν), 2937 (C-H ar et alk ν), 1655 et 1617 (C=O ν), 1503 (N-H δ), 1446 et 1409 (C-H δ alk), 1342 (C-O ν)

SM (ES-) m/z calc pour C₈H₁₃O₅N₂ : 217,0824, exp : 217,0838

Analyses élémentaires : calculé pour C₈H₁₄O₅N₂, 1,2 H₂O (%) C : 40,06, H : 6,89, N : 11,68
trouvé (%) C : 39,55, H : 6,34, N : 11,50

Acide (2S,4R)-4-(3-(méthylamino)-3-oxopropyl)glutamique 83 (C₉H₁₆N₂O₅, 232,23 g/mol).



RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,56 (2H, m, H⁶), 1,63 (1H, ddd, J = 5,2, 8,6 et 14,0 Hz, H^{3a}), 1,93 (1H, ddd, J = 4,8, 9,8 et 14,0 Hz, H^{3b}), 1,98 (2H, m, H⁷), 2,25 (1H, m, H⁴), 2,41 (3H, s, CH³), 3,45 (1H, dd, J = 5,0 et 8,7 Hz, H²)

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ : 25,8 (CH₃), 28,15 (C⁶), 32,5 (C³), 33,1 (C⁷), 42,2 (C⁴), 53,1 (C²), 173,8 (C⁸), 176,0 (C¹), 179,4 (C⁵)

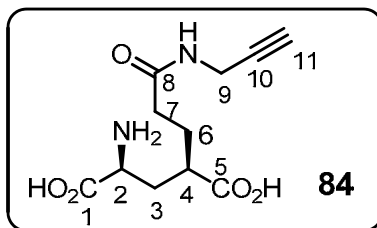
PF = 124-130 °C

$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, HCl 6N) = + 30

IR (KBr, cm⁻¹) : 3426, 3419 (N-H et O-H ν), 3232 et 2941 (C-H alk ν), 1702 (C=O acide ν), 1636 et 1620 (C=O aa ν), 1557 (N-H δ), 1407 (C-H δ), 1267, 1163 (C-O ν).

MS (ES-) m/z calc pour C₉H₁₆N₂O₅Na : 255,0957, exp : 255,0961

Acide (2S,4R)-4-(3-oxo-3-(prop-2-ynylamino)propyl)glutamique 84 ($C_{11}H_{16}N_2O_5$, 256,26g/mol).



Le produit est obtenu selon le protocole général de transamination des composés comportant la fonction amide.

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 1,9 (3H, m, H^6 et H^{3a}), 2,16 (3H, m, H^7 et H^{3b}), 2,87 (2H, m, H^4 et H^{11}), 3,79 (1H, dd, $J = 5,4$ et $8,32$ Hz, H^2), 3,95 (2H, d, $J = 2,52$ H^9).

RMN ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$) δ 27,13 (C^6) 28,26 (C^{11}), 32,34 (C^3), 32,84 (C^7), 41,52 (C^4), 52,97 (C^2), 173,55 (C^8), 175,28 (C^1). 178,59 (C^5).

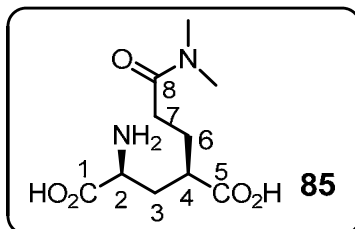
SM (ES-) m/z calculé pour $C_{11}H_{17}N_2O_5$: 257, 1149, exp: 257, 1137.

PF: 110°C

Analyses élémentaires calculé pour $C_{16}H_{19}NO_6$ 0,5 H_2O (%) C : 49,81, H : 6,46, N: 10,6

trouvé (%) C : 49,81, H : 6,46, N: 10,6

Acide (2S,4R)-4-(3-(diméthylamino)-3-oxopropyl)glutamique 85 ($C_{10}H_{18}N_2O_5$, 246,26 g/mol)



RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,93 (3H, m, H^6 et H^{3a}), 2,29 (1H, ddd, $J = 5,6$, 9,6 et 14,8 Hz, H^{3b}), 2,48 (2H, t, $J = 8$ Hz, H^7), 2,65 (1H, m, H^4), 2,92 (3H, s, CH_3), 3,07 (3H, s, CH_3) 3,81 (1H, dd, $J = 5,2$ et 8 Hz, H^2)

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 27,48 (C^6), 30,18 (C^3), 32,45 (C^7), 35,47 (CH_3), 37,47 (CH_3) 41,57 (C^4), 53,03 (C^2), 173,57 (C^8), 174,89 (C^1), 178,73 (C^5)

PF = 145 °C

$[\alpha]_D^{25}$ ($c = 0,7$, MeOH) = - 7.

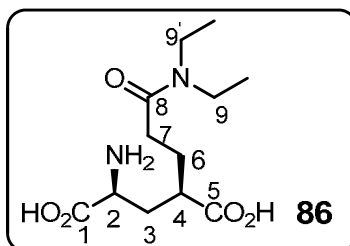
IR (KBr, cm^{-1}) : 3613 - 2500 (N-H , O-H C-H alk v), 1702 (C=O acide v), 1696 et 1617 (C=O v), 1496 (N-H δ), 1417 (C-H δ), 1249, 1227 (C-O v).

MS (ES-) m/z calc pour $C_{10}H_{17}N_2O_5$: 245,1143, exp : 245,1137.

Analyses élémentaires : calculé pour $C_9H_{15}NO_6$, 1 H_2O (%) C : 45,45, H : 7,63, N : 10,60.

trouvé (%) C : 45,58, H : 7,46, N : 10,64.

Acide (2S,4R)-4-(3-(diethylamino)-3-oxopropyl) glutamique 86 ($C_{12}H_{22}N_2O_5$, 274,31 g/mol)



RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 1,08 (3H, t, $J = 6,6$ Hz, CH_3), 1,54 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, CH_3), 1,93 (3H, m, H^6 et H^{3a}), 2,35 (1H, m, H^{3b}), 2,46 (2H, t, $J = 2$ Hz, H^7), 2,64 (1H, m, H^4), 3,34 (4H, q, $J = 7,2$ Hz, H^9 et H^9), 3,79 (1H, dd, $J = 5,5$ et $8,3$ Hz H^2).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 12,01 (CH_3), 13,01 (CH_3), 27,13 (C^6), 29,94 (C^3), 32,43 (C^7), 40,79 (C^9), 41,55 (C^4), 42,86 (C^9), 52,92 (C^2), 173,93 (C^8), 173,50 (C^1), 173,92 (C^5).

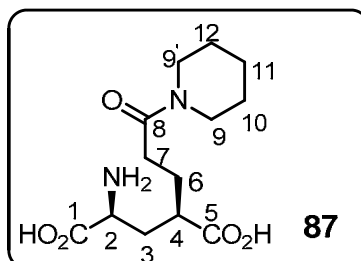
SM (ES+) m/z calc pour $C_{12}H_{22}N_2O_5Na$: 297,1418, exp: 297, 1426.

PF: 145°C

$[\alpha]_D^{25}$ (c 0.96, HCl, 26°C) = + 42,08.

Analyses élémentaires : calculé pour $C_9H_{15}NO_6$, 1,5 H_2O (%) C : 48,56, H : 8,32, N : 9,44.
trouvé (%) C : 48,81, H : 8,23, N : 9,44.

Acide (2S,4R)-4-(3-oxo-3-(pipéridin-1-yl)propyl)glutamique 87 ($C_{13}H_{22}N_2O_5$, 286,32 g/mol)



RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 1,52 (2H, m, H^{11}), 1,6 (4H, m, H^{10} et H^{12}), 1,89 (2H, m, H^6), 1,96 (1H, ddd, $J = 4,5$, $6,4$, et $14,7$ Hz, H^{3a}), 2,35 (1H, m, H^{3b}), 2,46 (2H, t, $J = 2$ Hz, H^7), 2,64 (1H, m, H^4), 2,49 (4H, t, $J = 7,9$ Hz, H^9 et H^9), 3,79 (1H, dd, $J = 5,4$ et $8,3$ Hz, H^2).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 23,64 (C^{11}), 25,92 et 25,21 (C^{12}) et (C^{10}), 27,80 (C^6), 30,18 (C^3), 32,38 (C^7), 41,56 (C^4), 47,30 et 43,39 (C^9) et (C^9), 52,92 (C^2), 172,77 (C^8), 173,52 (C^1), 178,63 (C^5).

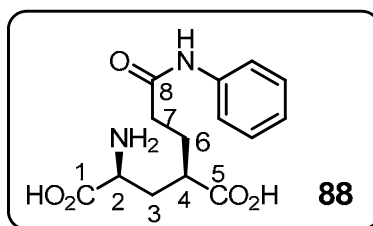
IR (KBr, cm^{-1}): 3426, (N-H et O-H ν), 2941 (C-H alk ν), 1694, 1639 et 1593 (C=O ν), 1484 (N-H δ), 1445 (C-H δ), 1256, 1141 (C-O ν).

SM (ES+) m/z calculé pour $C_{13}H_{22}N_2O_5Na$: 309, 1430, exp: 309, 1426.

PF: 170°C

$[\alpha]_D^{25}$ (c 0.84, HCl) = + 41,19.

Analyses élémentaires calculé pour $C_{13}H_{22}N_2O_5$ (%) C : 54,53, H : 7,74, N : 9,78.
trouvé (%) C : 54,37, H : 7,38, N : 9,61.

Acide (2S,4R)-4-(3-oxo-3-(phénylamino)propyl)glutamique 88 (C₁₄H₁₈N₂O₅ 294,30 g/mol)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O à pH = 7 avec LiOH 0,1M) δ 1,87 (3H, m, H⁶ et H^{3a}), 2,14 (1H, m, H^{3b}), 2,43 (3H, m, H⁷ et H⁴), 3,61 (1H, m, H²), 7,34 (5H, m, H^{ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O à pH = 7 avec LiOH 0,1M) δ 28,49 (C⁶), 33,1 (C³), 34,31 (C⁷), 44,61 (C⁴), 53,30 (C³), 122,11, 125,57, 129,12 (CH^{ar}), 136,67 (C^{ar}), 174,40 (C⁸), 182,31 (C⁵), 174,74 (C¹).

IR (KBr, cm⁻¹) : 3436, 3324 (N-H et O-H ν), 3124 2934 (C-H alk ν), 1692, 1645 et 1601 (C=O ν), 1536 (N-H δ), 1497 (C-H δ), 1222, 1149 (C-O ν).

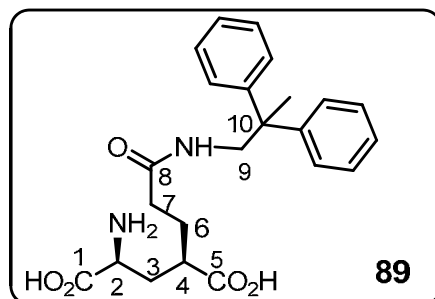
SM (ES⁺) m/z calc pour C₁₃H₁₉N₂O₅: 295, 1286, exp: 295, 1294.

PF: 172°C.

[α]_D²⁵ (c= 0.78, MeOH) = - 44,638.

Analyses élémentaires calculé pour C₁₃H₂₂N₂O₅ (%) C : 57,13, H : 6,16, N: 9,52

trouvé (%) C : 57,18, H : 6,15, N: 9,18

Acide (2S,4R)-4-(3-(2,2-diphénylpropylamino)-3-oxopropyl)glutamique 89 (C₂₃H₂₈N₂O₅, 412,48 g/mol)

Le produit est obtenu selon le procédé général de transamination. La purification a été réalisée selon le protocole décrit pour les composés hydrophobes.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,58 (2H, m, H⁶), 1,65 (3H, s, CH₃), 1,81 (1H, ddd, J = 4,4, 9,2, et 11,2 Hz, H^{3a}), 2,08 (3H, m, H⁷, et , H^{3b}), 2,26 (1H, m, H⁴), 3,64 (1H, dd, J = 4 et 9,2 Hz H²), 3,96 (2H, d, J = 2,4, H⁹), 7,3 (10H, m, H^{ar}).

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ 25,45 (CH₃), 28,77 (C⁶), 32,86 (C³), 33,73 (C⁷), 44,48 (C⁴), 46,91 (C⁹), 48,33 (C¹⁰), 53,20 (C²), 126,51, 127,43, 128,43 (C^{Har}), 147,11 (C^{ar}), 174,37 (C⁸), 175,92 (C¹), 182,07 (C⁵).

IR (KBr, cm⁻¹) : 3809 – 2500 (N-H ν, O-H ν C-H ar ν, C-H alk ν), 1633 (C=O ν), 1500 (N-H C-H δ), 1416 (C-H δ), 1128 (C-O δ).

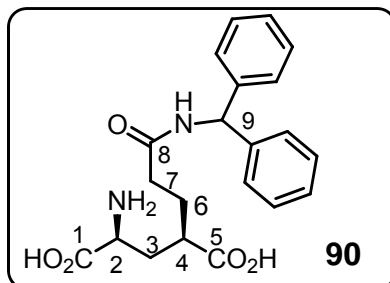
SM (ES⁺) m/z calculé pour C₂₃H₂₈N₂O₅Na: 435,1905, exp: 435,1896.

Analyse HPLC (colonne : Acchain 120, C₁₈, 5μm, 4,6 x 250 mm ; élution : gradient de H₂O / CH₃CN 95/5 à 5/95 en 30 minutes; débit : 800μL à 225 nm) : T_R = 18,2 min, pureté = 98 %

PF : 134°C

$[\alpha]_D^{25}$ (c0.69, H₂O) = -8

Acide (2*S*,4*R*)-4-(3-(benzhydrylamino)-3-oxopropyl)glutamique 90 (C₂₁H₂₄N₂O₅, 384,43 g/mol)



Le produit est obtenu selon le procédé général de transamination. La purification a été réalisée selon le protocole décrit pour les composés hydrophobes.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,84 (3H, m, H⁶ et, H^{3a}), 2,14 (1H, m, H^{3b}), 2,35 (2H, m, H⁷, et, H⁴), 3,2 (1H, dd, J = 4 et 9,6 Hz, H²), 6,05 (1H, s, H⁹), 7,36 (10H, m, H^{ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 28,74 (C⁶), 33,06 (C³), 33,65 (C⁷), 44,67 (C⁴), 53,28 (C²), 57,51 (C⁹), 127,23, 125,69, 128,85 (CH^{ar}), 140,91 (C^{ar}), 174,38 (C⁸), 175,17 (C¹), 182,17 (C⁵)

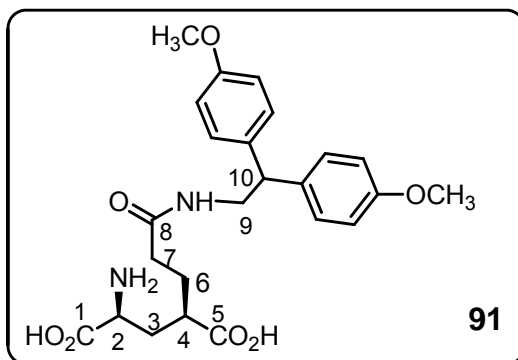
IR (KBr, cm⁻¹) : 3625 - 2500 (N-H, O-H v, C-H ar et C-H alk v), 1631 (C=O v), 1400 (N-H δ et C-H δ), 1017 (C-O v).

SM (ES⁺) m/z calculé pour C₂₁H₂₄N₂O₅Na: 407,1602, exp: 407,1583.

Analyse HPLC (colonne : Acchain 120, C₁₈, 5μm, 4,6 x 250 mm ; élution : gradient de H₂O / CH₃CN 95/5 à 5/95 en 30 minutes; débit : 800μL à 225 nm) : T_R = 16,9 min, pureté = 90 %.

PF : 155°C

Acide (2*S*,4*R*)-4-(3-(2,2-bis(4-méthoxyphényl)éthylamino)-3-oxopropyl) glutamique 91 (C₂₄H₃₀N₂O₇, 458,50 g/mol)



Le produit est obtenu selon le procédé général de transamination. La purification a été réalisée selon le protocole décrit pour les composés hydrophobes.

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,52 (2H, m, H^{6a} et H^{6b}), 1,76 (1H, m, H^{3b}), 2,0 (2H, m, H^{3b}), 2,06 (2H, m, H^7), 2,19 (1H, m, H^4), 3,60 (1H, dd, $J = 3,9$ et $9,6$ Hz, H^{3a}), 3,75 (5H, m, H^9 et CH_3), 4,16 (2H, t, $J = 8,3$ Hz, H^{10}), 6,94 (4H, d, $J = 8$ Hz, H^{ar}), 8,72 (4H, d, $J = 8,7$ Hz, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 28,74 (C^6), 32,78 (C^3), 33,68 (C^7), 43,62 (C^9), 44,32 (C^4), 48,31 (C^{10}), 53,16 (C^2), 55,15 (OCH_3), 114,01 et 128,89 (CH^{ar}), 134,86 et 157,43 (C^{ar}), 174,32 (C^8), 175,47 (C^1), 181,78 (C^5).

IR (film, cm^{-1}) : 3809 – 2500 (N-H v, O-H v, C-H ar v, C-H alk), 1621 (C=O v), 1512 (N-H C-H δ), 1404 (C-H δ), 1249 (C-O ar δ).

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_7$: 459, 2143, exp: 459, 2131.

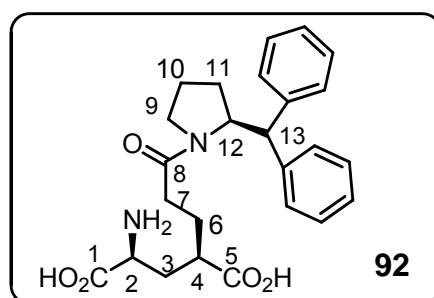
PF : 120-124°C

Analyse HPLC (colonne : Acchain 120, C_{18} , 5 μm , 4,6 x 250 mm ; élution : gradient de H_2O / CH_3CN 95/5 à 5/95 en 30 minutes; débit : 800 μL à 225 nm) : $T_R = 17,49$ min, pureté = 82 %.

PF : 120-124°C

$[\alpha]_D^{25}$ (c 0.75, H_2O) = - 24,5.

Acide (2S,4R)-2-amino-4-(3-((2S)-2-benzhydrylcyclopentylamino)-3-oxopropyl) glutamique 92 $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$ 452,54 g/mol



Le produit est obtenu selon le procédé général de transamination. La purification a été réalisée selon le protocole décrit pour les composés hydrophobes.

On observe par RMN la présence deux rotamères dans un rapport 62/38.

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 0,869 - 2,305 (21H, m, H^6 , H^7 , H^{10} , H^{11} , H^3 , H^4), 3,369 – 3,659 (4H, m, H^9), 3,627 – 3,720 (2H, m, H^2), 4,01 (1H, d, $J = 10,8$ Hz, H^{13} , isomère majoritaire), 4,18 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H^{13} , isomère minoritaire), 4,79 (1H, m, H^{12} , isomère majoritaire), 4,94 (1H, m, H^{12} , isomère majoritaire), 7,3 (10H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 20,47 et 22,54 (C^{10} , et C^{11}), 27,91 et 28,1 (C^6), 29,53 et 30,34 (C^7), 32,48 et 32,98 (C^3), 43,62 et 44,31 (C^4), 45,05 et 46,59 (C^9), 52,58 et 53,30 (C^{13}), 53,42 (C^3), 59,87 et 62,73 (C^{12}), 122,45, 126,65, 126,84, 127,25, 128,09, 128,78 et 129,088 (CH^{ar}), 140,95, 141,32, 141,67 et 142,08 (C^{ar}), 173,28 (C^8), 174,37 et 174,57 (C^1), 181,22 et 181,69 (C^5).

IR (film, cm^{-1}) : 3619 – 2500 (N-H v, O-H v C-H ar v, C-H alk), 1621 (C=O v), 1449 (N-H δ), 1440 (C-H δ), 1166 (C-O ar δ), 757 (C-H ar δ).

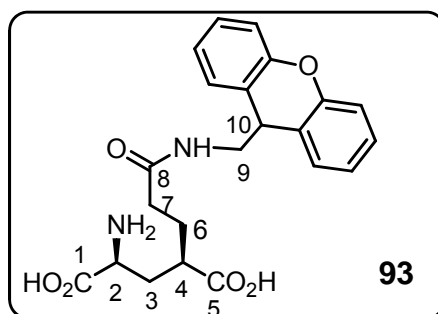
SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$: 461, 2058, exp: 461, 2052.

Analyse HPLC (colonne : Acchain 120, C_{18} , 5 μm , 4,6 x 250 mm ; élution : gradient de H_2O / CH_3CN 95/5 à 5/95 en 30 minutes; débit : 800 μL à 225 nm) : $T_R = 18,4$ min, pureté = 83 %.

PF : 150°C.

$[\alpha]_D^{25}$ (c 0.75, H_2O) = - 35.

Acide (2R,4S)-4-(3-((9H-xanthen-9-yl)méthylamino)-3-oxopropyl)glutamique 93
 (C₂₂H₂₄N₂O₆, 412,44 g/mol)



Le produit est obtenu selon le procédé général de transamination. La purification a été réalisée selon le protocole décrit pour les composés hydrophobes.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,58 (2H, m, H⁶), 1,82 (1H, ddd, J = 4, 9,6 et 14,8 Hz, H^{3a}), 2,06 (2H, t, J = 4 Hz, H⁷), 2,11 (1H, m, H^{3b}), 2,23, (1H, m, H⁴), 3,42 (2H, m, H⁹), 3,65 (1H, dd, J = 3,9, et 9,6 Hz, H²), 4,16 (1H, t, J = 5,6 Hz, H¹⁰), 7,22 (8H, m, H^{ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 28,63 (C⁶), 32,86 (C³), 33,07 (C⁷), 41,45 (C¹⁰), 44,4 (C⁴), 46,85 (C⁹), 53,19 (C²), 114,01, 123,45 128,17 et 129,14 (CH^{ar}), 122,22 (C^{ar}), 151,51 (C^{ar}), 174,32 (C⁸), 175,12 (C¹), 181,75 (C⁵).

IR (KBr, cm⁻¹) : 3619 – 2500 (N-H ν, O-H ν, C-H ar ν, C-H alk), 1621 (C=O ν), 1547 (N-H δ), 1479 (C-H δ), 1249 (C-O ar δ), 757 (C-H ar δ).

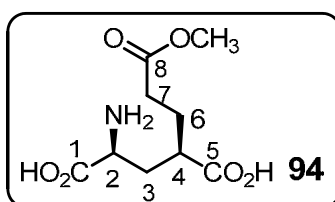
SM (ES⁺) m/z calc pour C₂₂H₂₄N₂O₆Na: 435,1541, exp: 435,1532.

Analyse HPLC (colonne : Acchain 120, C₁₈, 5μm, 4,6 x 250 mm ; élution : gradient de H₂O / CH₃CN 95/5 à 5/95 en 30 minutes; débit : 800μL à 225 nm): T_R = 18,2 min, pureté = 86 %.

PF : 172°C

[α]_D²⁵ (c 0.75, H₂O) = - 40.

Acide (2S,4R)-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)glutamique 94 (C₉H₁₅NO₆, 233,22 g/mol)



Après transamination, le produit est directement purifié sur résine basique (Dowex 2x8-400).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,90 (2H, m, H⁶), 1,94 (1H, m, H^{3a}), 2,25 (1H, ddd, J = 5,2, 9,6 et 14,8 Hz, H^{3b}), 2,47 (2H, m, H⁷), 2,59 (1H, m, H⁴), 3,69 (3H, s, OCH₃), 3,75 (1H, dd, J = 5,5 et 8,5 Hz, H²)

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ: 25,3 (C⁶), 31,2 (C⁷), 32,5 (C³), 41,8 (C⁴), 52,2 (OCH₃), 53,1 (C²), 173,0 (C⁸), 176,2 (C¹), 179,2 (C⁵)

PF: 135 – 138 °C

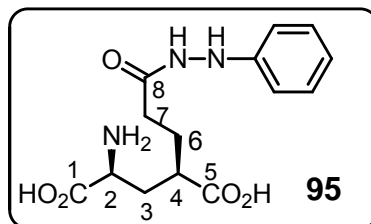
$$[\alpha]_D^{25} (c\ 1, HCl\ 6N) = + 29$$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3426 (N-H et O-H ν), 3232 et 2941 (C-H alkyl ν), 1724 et 1703 (C=O ester et acide ν), 1636 et 1620 (C=O aa ν), 1495 (N-H δ), 1443 et 1407 (C-H δ), 1214 (C-O ν)

SM (ES+) m/z calc pour $C_9H_{16}NO_6$: 234,0978, exp : 234,0982

Analyses élémentaires : calculé pour $C_9H_{15}NO_6, 2/3\ H_2O$ (%) C : 44,08, H : 6,71, N : 5,75.
trouvé (%) C : 44,12, H : 6,60, N : 5,81.

Acide (2S,4R)-4-(3-oxo-3-(2-phénylhydrazinyl)propyl)glutamique 95 ($C_{14}H_{19}N_3O_5$, 309,32 g/mol)



Après transamination, le milieu réactionnel est directement purifié sur résine basique (Dowex 1x8-400).

On observe la présence des deux rotamères dans D_2O (93/7) et dans le DMSO (86/14).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 1,92 (3H, m, H^6 et H^{3a}), 2,24 (1H, m, H^{3b} , isomère minoritaire) 2,34 (1H, ddd, $J = 6, 9,6$ et $15,2$ Hz, H^{3b} isomère majoritaire), 2,47 (2H, m, H^7), 2,69 (1H, m, H^4), 3,77 (1H, dd, $J = 6$ et 8 Hz, H^2) et 3,86 (1H, dd, $J = 6$ et 8 Hz, H^2), 7,11 (5H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 27,7 (C^6), 30,86 (C^3), 32,17 (C^7), 41,22 (C^4), 52,58 (C^2), 112,58, 113,36, 120,87, 121,21, 129,46 et 129,57 (CH^{ar}), 147,19 (C^{ar}), 173,0 (C^8), 175,37 (C^1), 178,15 (C^5).

IR (KBr, cm^{-1}) : 3440 – 2920 (N-H et O-H ν , C-H ar ν et C-H alk ν), 1700 (acide ν), 1666 (C=O aa ν), 1600 (N-H δ), 1496 (C-H δ), 1220 (C-O ν).

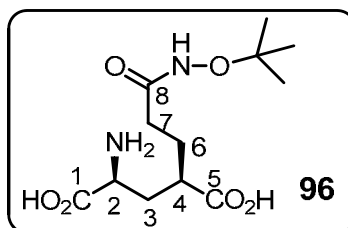
SM (ES+) m/z calc pour $C_{14}H_{19}N_3O_5$: 310,1408, exp:310,1403.

PF : 136°C.

$$[\alpha]_D^{25} (c\ 0.6, MeOH) = + 8.$$

Analyses élémentaires calculé pour $C_{14}H_{19}N_3O_5, 1,5\ H_2O$ (%) C : 49,99, H : 6,59, N : 12,49.
Trouvé (%) C : 50,32, H : 6,19, N : 12,22.

Acide (2S,4R)-4-(3-(tert-butoxyamino)-3-oxopropyl)glutamique 96 (C₁₂H₂₂N₂O₆, 290,31 g/mol)



Après transamination, le milieu réactionnel est directement purifié sur résine basique (Dowex 1x8-400).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,25 (9H, m, CH₃), 1,93 (3H, m, H⁶ et H^{3a}), 2,28 (3H, m, H⁷ et H^{3b}), 2,6 (1H, m, H⁴), 3,79 (1H, dd, J = 5,6 et 8 Hz, H²).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ: 25,33 (CH₃), 28,18 (C⁶), 30,28 (C³), 32,69 (C⁷), 41,53 (C⁴), 52,58 (C²), 84,29 (C⁹), 172,95 (C⁸), 173,56 (C¹), 178,31 (C⁵).

IR (KBr, cm⁻¹) : 3445, 3190 (N-H et O-H v), 2980 (C-H alk v), 1640 (C=O aa v), 1500 (N-H δ), 1369 (C-H δ), 1184 (C-O v).

SM (ES+) m/z calculé pour C₁₂H₂₂N₂O₆: 291, 1546, exp: 291, 1556.

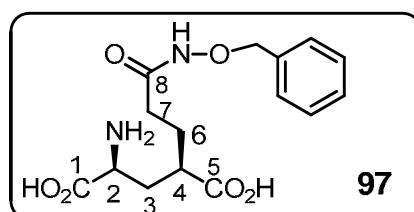
PF : 137°C.

[α]_D²⁵ (c 0.7 MeOH) = + 7,6.

Analyses élémentaires calculé pour C₁₂H₂₂N₂O₅ 1H₂O (%) C : 46,57, H : 7,85, N : 9,09.

trouvé (%) C : 46,69, H : 7,7, N : 9,12.

Acide (2S,4R)-4-(3-(benzyloxyamino)-3-oxopropyl)glutamique 97 (C₁₅H₂₀N₂O₆, 324,33 g/mol)



Après transamination, le produit est directement purifié sur résine basique (Dowex 1x8-400 ions).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O à pH = 7 avec LiOH 0,1M) δ 1,72 (2H, m, H⁶), 1,86 (1H, ddd, J = 4,4, 9,2 et 14,8 Hz, H^{3a}), 2,11 (3H, m, H^{3b} et H⁷), 2,32 (2H, m, H⁴), 3,67 (1H, dd, J = 3,6 et 9,2 Hz, H²), 4,9 (2H, s, H⁹), 7,48 (5H, m, H^{ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ: 28,27 (C⁶), 30,38 (C⁷), 32,93 (C³), 44,45 (C⁴), 53,26 (C²), 78,19 (C⁹), 128,69, 129,18, et 129,85 (CH^{ar}), 134,58 (C^{ar}), 172,08 (C¹), 174,37 (C⁸), 182,02 (C⁵).

IR (KBr film, cm⁻¹) : 3482 – 2464 (N-H et O-H v, C-H ar v, et C-H alk v), 1696 (C=O acide v), 1666 (C=O aa v), 1493 (N-H δ), 1409 (C-H δ), 1216, 1148 (C-O v).

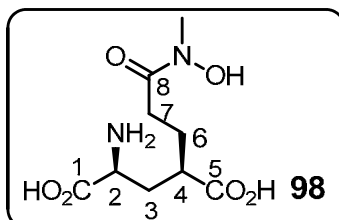
SM (ES-) m/z calculé pour C₁₅H₁₉N₂O₆: 323, 1235, exp: 323, 1243.

PF: 137°C

$[\alpha]_D^{25}$ (c 0.8, MeOH) = - 5, 09.

Analyses élémentaires calculé pour $C_{15}H_{20}N_2O_6 \cdot 0,25 H_2O$ (%) C : 54,79, H : 6,28, N : 8,52.
trouvé (%) C : 54,91, H : 6,13, N : 8,60.

Acide (2*S*,4*R*)-4-(3-(hydroxy(méthyl)amino)-3-oxopropyl)glutamique 98 ($C_9H_{16}N_2O_6$, 248,23 g/mol)



Après transamination, le milieu réactionnel est déposé directement sur une colonne de résine fortement acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est lavée abondamment à l'eau afin d'éliminer le cétoacide résiduel, l'excès d'ACS et l'acide pyruvique. Une seconde élution avec une solution aqueuse d'acétate d'ammonium 1M permet de décrocher le produit de la résine. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le produit est dissous dans H_2O (5 mL) et concentré sous pression réduite. Cette opération est répétée plusieurs fois pour éliminer l'acétate d'ammonium. Le résidu est dilué dans H_2O (5mL) et déposé sur une résine basique Dowex équilibrée avec des ions bicarbonates. La colonne est élue à l'eau puis avec un gradient de bicarbonate d'ammonium (0,1 à 1 M). Les fractions contenant le produit désiré sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le résidu est dissous dans H_2O (5 mL) et concentré sous pression réduite. Cette opération est répétée plusieurs fois pour éliminer le bicarbonate d'ammonium. Le produit est ensuite lyophilisé et isolé sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de **35 %**.

On observe par RMN la présence de deux rotamères dans un rapport 80/20 dans D_2O (isomère majoritaire = M ; minoritaire = m).

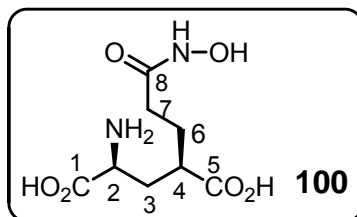
RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 1,79 (2H, m, H^6), 1,86 (1H, ddd, $J = 4,4$ et $9,2$, et 14 Hz, H^{3a}), 2,13 (1H, ddd, $J = 4, 10$ et 14 Hz, H^{3b}), 2,34 (1H, m, H^4), 2,46 (2H, t, $J = 8$ Hz, H^7), 3,23 (3H, s, CH_3 , M), 3,37 (3H, s, CH_3 , m), 3,65 (1H, dd, $J = 4$ et $9,2$ Hz, H^2).

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ : 27,1 (C^6 , M), 27,84 (C^6 , m), 29,49 (C^3 , M), 30,21 (C^3 , m), 32,96 (C^7 , M), 33,08 (C^7 , m), 35,85 (CH_3 , M), 38,69 (CH_3 , m), 44,3 (C^4), 53,27 (C^2), 174,34 (C^1), 175,07 (C^8), 182,04 (C^5)

IR (KBr, cm^{-1}) : 3400 – 2325 (N-H et O-H ν , et C-H alk ν), 1622 (C=O aa ν), 1387 (N-H δ , C-H δ), 1175 (C-O ν).

SM (ES-) m/z calculé pour $C_9H_{15}N_2O_6$: 247, 0934, exp: 247, 0930.

Pureté trouver par HPLC (colonne : Acchain 120, C_{18} , $5\mu m$, $4,6 \times 250$ mm ; élution : gradient de H_2O / CH_3CN 95/5 à 5/95 en 30 minutes; débit : $800\mu L$ à 210 et 225 nm) : $T_R = 3,4$ min pureté = 99 %.

Acide (2S,4R)-4-(3-(hydroxyamino)-3-oxopropyl)glutamique 100 (C₈H₁₄N₂O₆, 234,21 g/mol)

A une solution du composé **97** (0,06 g, 0,185 mmol), dans H₂O (10 mL) on ajoute du Pd/C à 10 % (0,040 g). Le milieu réactionnel est agité pendant 2 heures à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Après filtration sur membrane (millipore, 0,22 µm) et évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie échangeuse d'ions (Dowex 1x8-400). La colonne est éluée à l'eau puis avec un gradient d'acide acétique. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le produit est ensuite lyophilisé et isolé sous la forme d'un solide jaune clair avec un rendement de **(85 %)**.

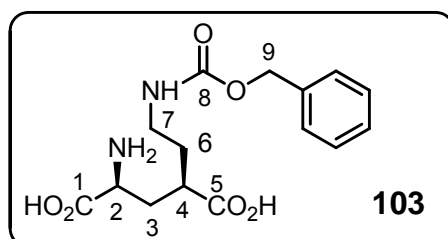
RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,89 (3H, m, H⁶ et H^{3a}), 2,22 (3H, m, H^{3b} et H⁷), 2,57 (1H, m, H⁴), 3,75 (1H, dd, J = 5,6, et 8,4 Hz, H²)

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 27,70 (C⁶) 29,75 (C³), 32,34 (C⁷), 41,50 (C⁴), 52,99 (C²), 172,40 (C⁸), 173,58 (C¹), 178,57 (C⁵).

IR (KBr, cm⁻¹) : 3625 - 2500 (N-H, O-H v et C-H alk v), 1631 (C=O v), 1400 (N-H δ et C-H δ), 1107 (C-O v).

SM (ES+) m/z calculé pour C₈H₁₃N₂O₆: 233, 0773, exp: 233, 0774.

Pureté trouver par HPLC (colonne : Acchain 120, C₁₈, 5µm, 4,6 x 250 mm ; élution : gradient de H₂O / CH₃CN 95/5 à 5/95 en 30 minutes; débit : 800µL à 210 et 225 nm) : T_R = 3,5 min, pureté = 99 %

Acide(2S,4R)-4-(2-(benzyloxycarbonylaminoéthyl)glutamique 103 (C₁₅H₂₀N₂O₆, 324,33 g/mol)

Le produit est obtenu selon le protocole général de transamination.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,76 (2H, m, H⁶), 1,89 (1H, m, H^{3a}), 2,7 (1H, m, H^{3b}), 2,27 (1H, m, H⁴), 2,19 (2H, t, J = 6,4 Hz, H⁷), 3,74 (1H, dd, J = 5,6 et 8 Hz, H²), 5,1 (2H, s, H⁹), 7,42 (5H, m, H^{ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ:31,74 (C⁶), 32,38 (C³), 38,10 (C⁴) 39,73 (C⁷), 53 (C²), 66,87 (C⁹) 127,65 128,34 et 128,77 (CH^{ar}), 140,77 (C^{ar}), 158,33 (C⁸), 173,64 (C¹), 178,97 (C⁵).

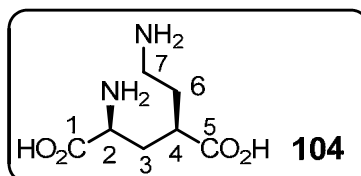
SM (ES+) m/z calculé pour C₁₅H₁₉N₂O₆ :323,1259 , exp :323,1243.

IR (KBr, cm^{-1}) : 3500 - 2500 (N-H et O-H ν , C-H ar ν , C-H alk), 1527 (C=O ν), 1400 (N-H δ et C-H δ), 1140 (C-O ν).

PF: 97°C

$[\alpha]_D^{25}$ (c 0,5, H_2O) = + 8,08

Acide (2S,4R)-4-(2-aminoéthyl)glutamique 104 ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$, 190,20 g/mol)



A une solution du composé **103** (0,087 g, 0,268 mmol), dans H_2O (5 mL) on ajoute du Pd/C à 10 % (0,030 g). Le milieu réactionnel est agité pendant 150 minutes à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Après filtration sur membrane (millipore, 0,22 μm) et évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie échangeuse d'ions (Dowex 1x8-400). La colonne est éluée avec H_2O . Les fractions contenant le produit désiré sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le produit est ensuite lyophilisé et isolé sous la forme d'un solide jaune clair (50 mg, quantitatif)

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,88 (3H, m, H^6 , H^{3a}), 1,89 (1H, ddd, $J = 4,4, 9,2$, et 14 Hz, H^{3b}), 2,41 (1H, m, H^4), 3,00 (2H, t, $J = 8$ Hz, H^7), 3,75 (1H, dd, $J = 4$ et 8 Hz, H^2).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 29,87 (C^6), 32,89 (C^3), 37,79 (C^7), 42,44 (C^4), 53,21 (C^2), 174,33 (C^1), 181,51 (C^5).

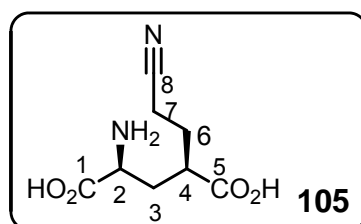
SM (ES-) m/z calculé pour $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$: 233,0773, exp : 233,0774.

IR (KBr, cm^{-1}) : 3500 - 2500 (N-H et O-H ν , C-H alk), 1549 (C=O ν), 1393 (N-H δ et C-H δ), 1147 (C-O ν).

PF: 98°C

$[\alpha]_D^{25}$ (c 0,6, H_2O) = -37,5

Acide (2S,4R)-4-(2-cyanoéthyl)glutamique 105 ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$, 200,19 g/mol)



Après transamination, le milieu réactionnel est directement purifié sur résine basique (Dowex 2x8-400).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,97 (3H, m, H^6 et H^{3a}), 2,28 (1H, m, H^{3b}), 2,52 (1H, m, H^4), 2,55 (2H, m, H^7), 3,79 (1H, t, $J = 6,4$ Hz, H^2).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 14,44 (C^7), 27,25 (C^6), 32,08 (C^3), 41,18 (C^4), 52,78 (C^2), 120,78 (C^8), 173,36 (C^1), 177,87 (C^5).

IR (KBr, cm^{-1}) : 3429 (N-H et O-H ν), 3221 et 2825 (C-H alkyles ν), 2225 ($\text{C}\equiv\text{N}$ ν), 1705 ($\text{C}=\text{O}$ aa ν), 1586 (N-H δ), 1498 et 1425 (C-H δ), 1211 (C-O ν)

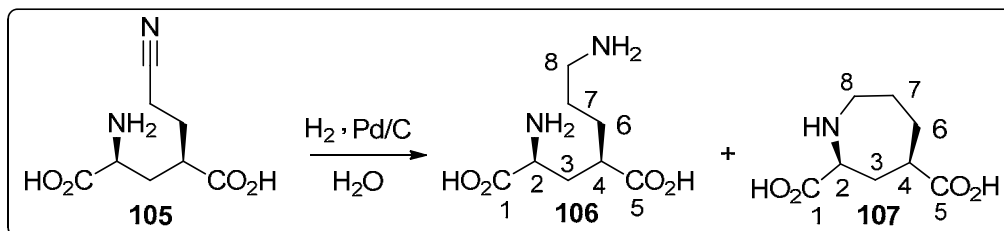
SM (ES⁻) m/z calculé pour $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4$: 199,0726, exp: 199,0719

$[\alpha]_D^{25}$ (c 0,7, H_2O) = + 15,8

Analyses élémentaires : calculé pour $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$, (%) C : 48,00, H : 6,04, N : 13,99

trouvé (%) C : 47,69, H : 6,04, N : 13,79.

Acide (2*S*,4*R*)-4-(3-aminopropyl)glutamique ($\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$, 204,22 g/mol) 106 et Acide (2*S*,4*R*)-azépane-2,4-dicarboxylique 107 ($\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4$, 187,19 g/mol)



A une solution du composé 105 (0,05 g, 0,25 mmol) dans H_2O (10 mL), on ajoute du Pd/C à 10 % (0,020 g). La solution est dégazée sous pression réduite et mise sous pression d'hydrogène de 6 bars pendant 2 jours. Après filtration sur membrane (millipore, 0,22 μm) et évaporation du solvant, le résidu est repris dans un minimum d'eau puis déposé sur une résine basique (Dowex 2X8-400) équilibrée avec des ions acétates. Les fractions contenant la diamine 106 sont rassemblées, concentrées sous pression réduite puis le produit est isolé après lyophilisation sous la forme d'un solide blanc (30 mg, 59%). Une élution avec un gradient d'AcOH (0,1 à 2M) permet de décrocher l'azépane 107. Les fractions contenant le produit désiré sont rassemblées, évaporées sous pression réduite. L'azépane a été obtenu sous la forme d'un solide blanc (20 mg, 42%).

- Diamine 106

La RMN fait apparaître 2 diastéréoisomères dans un rapport 98/2; seul l'isomère (2*S*, 4*R*) majoritaire est décrit.

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,6 (4H, m, H^6 , et H^7), 1,92 (1H, ddd, J = 4,8, 8,4 et 14,4 Hz, H^{3a}), 2,14 (1H, ddd, J = 4,4, 9,2 et 17,2 Hz, H^{3b}), 2,34 (1H, m, H^4), 2,99 (2H, t, J = 6,8 Hz, H^8), 3,72 (1H, dd, J = 4,4 et 8,4 Hz, H^2).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 24,28 (C^6), 28,99 (C^7), 33,10 (C^3), 39,23 (C^8), 44,47 (C^4), 53,31 (C^2), 174,55 (C^1), 182,76 (C^5).

SM (ES⁻) m/z calc pour $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4$: 203,1045, exp: 203,1032.

IR (KBr, cm^{-1}) : 3500 - 2500 (N-H et O-H ν , C-H alk), 1541 ($\text{C}=\text{O}$ ν), 1395 (N-H δ et C-H δ), 1067 (C-O ν).

PF: 140°C

$[\alpha]_D^{25}$ (c = 0,6, H_2O) = -9

- Azépane 107

Seul le diastéréoisomères (2*S*, 4*R*) est décrit.

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,3 (2H, m, H^{6a} et H^{7a}), 2,03 (2H, m, H^{7b} et H^{3a}), 2,18 (1H, m, H^{6b}), 2,63 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H^{3b}), 2,77 (2H, m, H^4), 3,31 (2H, t, $J = 5,2$ Hz, H^8), 3,86 (1H, d, $J = 10,8$ Hz, H^2).

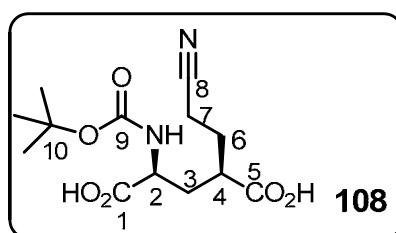
RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 22,58 (C^7), 29,20 (C^6), 31,17 (C^3), 43,36 (C^4), 44,79 (C^8), 59,50 (C^2), 173,77 (C^1), 179,31 (C^5).

SM (ES) m/z calc pour $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NO}_4$: 186,0763, exp: 186,0766.

IR (KBr, cm^{-1}) : 3500 - 2500 (N-H, O-H v et C-H alk v), 1397 (N-H δ et C-H δ), 1138 (C-O v).

PF: 70°C

Acide (2S,4R)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-(2-cyanoéthyl)glutamique **108**
($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ 300,31 g/mol)

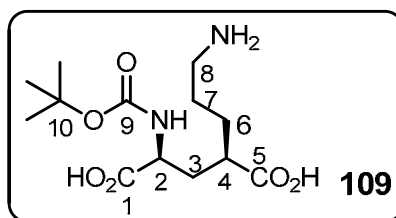


A une solution de composé **105** (0,092 g, 0,46 mmol) dans H_2O (3 mL) on ajoute de l'hydrogénocarbonate de sodium (0,231 g, 2,76 mmol) et le milieu réactionnel est refroidi à 0°C. Une solution de Di-*tert*-butyl dicarbonate (0,250 g, 1,15 mmol) dans le dioxane (1mL) est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 jours puis déposé sur une résine fortement basique (Dowex 1X8-400) équilibrée avec des ions HCO_3^- . La colonne est éluée à l'eau puis avec un gradient de bicarbonate d'ammonium (0,1 à 1M). Les fractions contenant le produit sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le produit est ensuite lyophilisé et isolé sous la forme d'un solide pateux (0,130 g, **94 %**).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,40 (9H, m, CH_3), 1,61 (1H, m, H^{3a}), 1,81 (2H, m, H^6), 1,98 (1H, m, H^{3b}), 2,44 (3H, m, H^4 et H^7), 3,75 (2H, dd, $J = 3,6$ et 10,4 Hz, H^2).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 14,92 (C^7), 27,59 et 27,71 (CH_3), 28,11 (C^6), 34,35 et 34,46 (C^3), 45,23 (C^4), 55,01 et 56,13 (C^2), 80,9 (C^{10}), 121,34 (C^8), 157,58 (C^9), 179,65 (C^1), 181,55 et 182,15 (C^5).

Acide(2S,4R)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-(2-cyanoéthyl)glutamique **109**
($\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$, 304,34 g/mol)



A une solution de composé **108** (0,055 g, 0,183 mmol) dans H_2O (5 mL) est ajouté du Pd/C à 10 % (0,033 g). Le milieu réactionnel est agité pendant 24 heures à température

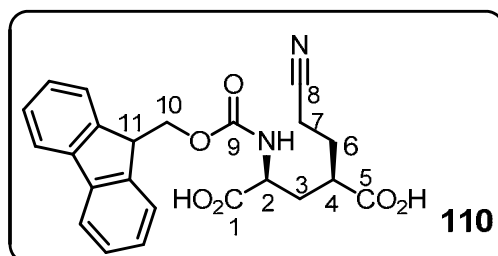
ambiante sous une atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Le milieu est ensuite filtré sur membrane (millipore, 0,22 μ m) et concentré sous pression réduite. Le résidu est déposé sur une colonne de résine basique (Dowex 1X8-400). La colonne est éluée avec H₂O puis avec un gradient d'AcOH (0,1 à 1M). Les fractions contenant le produit sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'un solide pateux (0,028 g, 50 %).

La RMN ¹³C montre la présence de deux rotamères.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,41 (9H, m, CH₃), 1,67 (5H, m, H⁶, et H^{3a}, et H⁷), 2,62 (1H, m, H^{3b}), 2,46 (1H, m, H⁴), 2,98 (2H, m, H⁸), 3,95 (2H, m, H²).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ : 24,65 (C⁷), 27,52 et 27,66 (CH₃), 28,88 (C⁶), 33,89 (C³), 39,18 (C⁸), 42,84 (C⁴), 53,79 et 55,08 (C²), 81,96 (C¹⁰), 157,4 (C⁹), 178,2 (C¹), 180,49 (C⁵).

Acide (2S,4R)-2-(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonylamino-4-(2-cyanoéthyl) glutamique 110 (C₂₃H₂₂N₂O₆, 422,43 g/mol)



A une solution de composé **105** (0,01 g, 0,05 mmol) dans H₂O (0,2 mL) est ajoutée du carbonate de sodium (0,018 g, 0,175 mmol). Le milieu réactionnel est refroidie à 0°C et une solution de chlorure de Fluorénylméthoxycarbonyl FMOC-Cl (0,026 g, 0,1 mmol) dans du dioxane (0,2 mL) est ensuite ajoutée. Le milieu est agité à température ambiante pendant une nuit puis déposé sur une résine basique (Dowex 1X8-400) équilibrée avec des ions bicarbonates. La colonne est éluée à l'eau puis avec un gradient de bicarbonate d'ammonium (0,1 à 1M). Les fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Après lyophilisation le produit est isolé sous la forme d'un solide pateux (0,018 g, **86** %).

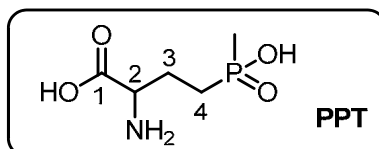
On observe par RMN la présence de deux rotamères dans un rapport 63/37 en solution dans D₂O.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,49 - 2,0 (4H, m, H⁶ et H³), 2,42 (3H, m, H⁷ et H⁴), 3,70 (1H, m, H², isomère minoritaire), 3,79 (1H, dd, J = 4 et 10,8 Hz, H², isomère majoritaire), 4,29 (2H, t, J = 5,6 Hz, H¹⁰), 4,49 (1H, m, H¹¹), 7,63 (8H, m, H^{ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ : 14,77 (C⁷), 27,70 et 27,88 (C⁶), 34,12 et 34,29 (C³), 44,09 et 44,25 (C⁴), 46,73 et 46,83 (C¹¹), 54,97 et 55,2 (C²), 66,25 (C¹⁰), 125 (CH^{ar}), 121,14 (C⁸) 127,43 et 127,93 (CH^{ar}), 140,81, et 143,76 et 143,85 (C^{ar}), 157,64 (C⁹), 179,52 (C¹), 182,13 (C⁵).

SYNTHESE DE LA PPT ET DE SES DERIVES

Acide 2-amino-4-(hydroxy (méthyl)phosphoryl)butanoïque(D, L PPT) ($C_5H_{12}NO_4P$, 181,13 g/mol)



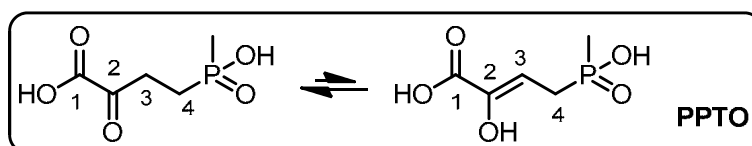
Une solution (50 mL) de glufosinate d'ammonium (120 g/l) est déposée sur colonne de résine acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est lavée abondamment à l'eau afin d'éliminer le colorant et le tensioactif présents dans la solution. Une seconde élution avec une solution aqueuse de NH_4OH (1M) permet de décrocher la PPT de la résine. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le sel d'ammonium de la PPT est ainsi isolé sous la forme d'un solide blanc (5,6 g, **93 %**). Un échantillon (0,2 g) est dissous dans H_2O (4 mL) et déposé sur une colonne de résine basique (Dowex 1X8-400). La résine est éluée avec un gradient d'AcOH (0,2-1M). Les fractions contenant la PPT sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Après lyophilisation, la PPT est isolée sous la forme d'un solide blanc (168 mg).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 1,05 (3H, d, $J = 15,4$ Hz, CH_3), 1,47 (2H, m, H^4), 1,83 (2H, m, H^3), 3,68 (1H, t, H^2 , $J = 4,15$ Hz, H^2).

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ 14,92 (d, $J = 92$ Hz, CH_3), 24,53 (C^3), 26,89 (d, $J = 90,6$ Hz, C^4), 55,06 (d, $J = 15$ Hz, C^2), 174,12 (C^1).

Analyses élémentaires : calculées pour $C_5H_{12}NO_4P \cdot 1 H_2O$ (%) C : 30,16, H : 7,09, N : 7,03
trouvées (%) C : 30,38, H : 7,02, N : 7,07

Acide 4-(Hydroxy(méthyl)phosphoryl)-2-oxobutanoïque PPTO ($C_5H_9O_5P$, 180,10 g/mol)



La PPT sous forme de sel d'ammonium (0,1 g, 0,5 mmol) est dissoute dans un tampon acétate (100 mM, pH = 5, 2,5 mL). Du phosphate de pyridoxal (PLP) (0,145 g, 0,55 mmol) et du $CuCl_2$ (0,034 g, 0,25 mmol) sont ajoutés et le pH est ajusté à 5. Le milieu est chauffé à $100^\circ C$ pendant 70 minutes. Après refroidissement à température ambiante, le milieu est déposé sur une résine acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H^+ 50 mL). La résine est lavée abondamment à l'eau. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le produit (PPTO) est isolé sous la forme d'une huile jaune (0,073 g, **81,5 %**).

On observe par RMN la présence de deux formes (cétone et énol) dans un rapport 87/13.

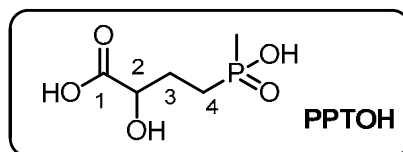
RMN ^1H (400 MHz, acétone- d_6) **forme cétone** δ 1,66 (3H, d, $J = 14,8$ Hz, CH_3), 2,18 (2H, m, H^4), 2,95 (2H, m, H^3); **forme énol** δ 1,59 (3H, d, $J = 14,4$ Hz, CH_3), 2,89 (2H, dd, $J = 8,4$ et $19,6$ Hz, H^4), 5,69 (1H, m, H^3), 8,5 (1H, s, OH).

RMN ^{13}C (100 MHz, acétone- d_6) **forme cétone** δ 14,24 (d, $J = 93$ Hz, CH_3), 23,43 (d, $J = 96$ Hz, C^4), 32,07 (C^3), 162,711 (C^1), 194,18 (d, $J = 14$ Hz, C^2).

forme énol δ 13,79 (d, $J = 94$ Hz, CH_3), 28,15 (d, $J = 91,7$ Hz, C^4), 102,45 (C^3), 144,53 (d, $J = 12$ Hz, C^2), 165,51 (d, $J = 2,8$ Hz, C^1).

SM (ES-) m/z calculé pour $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_5\text{P}$: 179, 0110, exp: 179, 0109

Acide 2-hydroxy-4-(hydroxy (méthyl) phosphoryl) butanoïque PPTOH ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_5\text{P}$, 182, 11 g/mol)

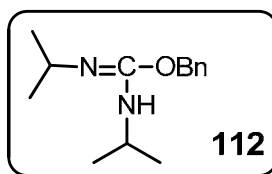


Le sel d'ammonium de la PPT (3 g, 15,14 mmol) est dissous dans une solution aqueuse de H_2SO_4 1M (30 mL). Le milieu est refroidi à 0°C et du nitrite de sodium (4,18 g, 60,55 mmol) est ajouté par petites quantités. Le milieu est ensuite agité à température ambiante pendant une heure. Le pH est ajusté à 7 avec une solution aqueuse de KOH 1M. Le solvant est évaporé puis le résidu est trituré avec MeOH (4x 50 mL) et filtré. Après évaporation du MeOH, un solide blanc est obtenu (6,77 g). Le solide est dissous dans H_2O (10 mL) et déposé sur une colonne de résine basique (Dowex 1X8-400). La résine est éluée à l'eau puis avec une solution aqueuse de TFA 0,2 M. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (2,4 g, **88 %**) d'une pureté estimée à 90 %. Une fraction (0,22 g) est ensuite déposée sur une résine basique (Séphadex QAE). La résine est éluée à l'eau puis avec un gradient d'acide formique (0,1 à 0,6 M). Les fractions contenant le produit sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu est dissous dans H_2O puis le pH est ajusté à 10 avec une solution aqueuse de KOH (1 M). La solution est agitée à température ambiante pendant une heure puis déposée sur une résine acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est éluée à l'eau. Les fractions contenant le produit pur sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le produit (PPTOH) pur est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,04 g).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,43 (3H, d, $J = 14$ Hz, CH_3), 1,88 (2H, m, H^4), 1,99 (2H, m, H^3), 4,27 (1H, m, H^2)

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ 13,32 (d, $J = 91,4$ Hz, CH_3), 24,82 (d, $J = 93$ Hz, C^4), 25,95 (d, $J = 3$ Hz, C^3), 69,63 (d, $J = 17$ Hz, C^2), 176,80 (C^1).

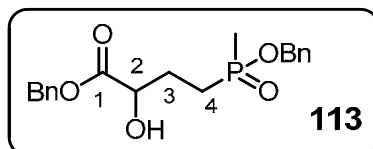
SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5\text{P}$: 181, 0260, exp: 181,0266.

N,N'-diisopropylcarbamiimidate de benzyle 112 (C₁₄H₂₂N₂O, 234,34 g/mol)

L'alcool benzylique (4,3 mL, 41,66 mmol), est ajouté à un mélange de N,N'-diisopropylcarbodiimide (5 g, 39,68 mmol) et de CuCl₂ (0,014 g, 0,1 mmol) refroidi à 0°C. Le milieu est agité à 0°C pendant une heure, puis à température ambiante pendant 48 heures.

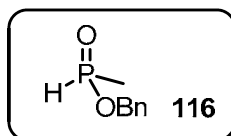
Le milieu est ensuite dilué avec du cyclohexane (10 mL), filtré sur alumine, et concentré sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (8,57 g, **90 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,1 (6H, d, CH₃), 3,2 (1H, m, CHNH), 3,47 (1H, s élargi NH), 3,8 (1H, m, CHN), 5,1 (2H, m, CH₂), 7,2 (5H, s, H^{ar}).

4-(benzyloxy(méthyl)phosphoryl)-2-hydroxybutanoate de benzyle 113 (C₁₉H₂₃O₅P 362,36 g/mol)

A une solution de composé **112** (0,745 g, 3,18 mmol) dans le DMF anhydre (3 mL) est ajoutée le PPTOH (0,193 g, 1,059 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à 50°C pendant 18 heures. Après refroidissement à température ambiante, H₂O (10 mL) est ajoutée puis la phase aqueuse est extraite avec Et₂O (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant: Et₂O / CH₂Cl : 6/4, CH₂Cl / MeOH 95/5). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,050 g, **13 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,33 (3H, J = 14 Hz, CH₃), 1,61 (3H, m, H⁴, et H^{3a}), 2,02 (1H, m, H^{3b}), 4,18 (1H, m, H²), 4,9 (2H, m, POCH₂Ph), 5,10 (2H, s, COCH₂Ph), 7,26 (10H, m, H^{ar}).

Méthylphosphinate de benzyle 116 (C₈H₁₁O₂P 170,15 g/mol)

A une solution de dichlorométhylphosphine (0,770 mL, 8,55 mmol) dans Et₂O anhydre (20 mL) à 0°C sont additionnés un mélange d'alcool benzylique anhydre (2,22 g, 2 mL) et de triéthylamine anhydre (0,865 g, 1,2 mL) dans Et₂O anhydre (10 mL) pendant 40 min sous forte agitation. Le milieu est ensuite agité à 32 °C pendant 4 heures. Après refroidissement à température ambiante, le précipité blanc formé est filtré puis lavé avec Et₂O.

Le filtrat est concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant: CH₂Cl₂/ MeOH : 97/03). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,860 g, **61 %**).

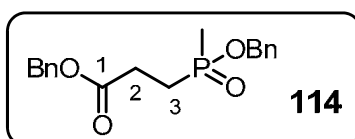
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,55 (3H, dd, J = 2 et 15,2 Hz, CH₃), 5,08 (2H, m, OCH₂Ph), 7,25 (1H, dd, J = 2 et 540 Hz PH), 7,38 (5H, m, H^{ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 15,12 (d, J = 94 Hz, CH₃), 67,59 (d, J = 6,1 Hz, POCH₂Ph), 128,30, 128,69 et 128,733 (CH^{ar}), 135,53 (d, J = 6 Hz, C^{ar})

RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) δ 34,32

SM (ES+) m/z calculé pour C₈H₁₁O₂PNa: 193, 0391, exp: 193, 0394.

3-(benzyloxy(méthyl)phosphoryl)propanoate de benzyle **114** (C₁₈H₂₁O₄P 332,33 g/mol)



A une solution de composé **116** (0,250 g, 1,47 mmol) dans le THF anhydre (6 mL) est ajouté de la triéthylamine anhydre (0,410 mL, 2,94 mmol). Après refroidissement du milieu à 0°C, du triméthylchlorosilane (0,373 mL, 2,94 mmol) est alors ajouté. Après agitation pendant 4 heures à température ambiante, une solution d'acrylate de benzyle (0,248 mg, 1,47 mmol) dans du THF anhydre (2 mL) est additionnée. Le milieu est chauffé à reflux pendant 4 heures. Après refroidissement à température ambiante, le milieu est transvasé dans une bécher contenant de la glace puis la phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂ (2 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair (éluant: CH₂Cl₂/ MeOH : 97/03). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,280 g, **78 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,46 (3H, d, J = 14 Hz, CH₃), 2,10 (2H, m, H³), 2,64 (2H, m, H²), 5,02 (2H, d, J = 8,4 Hz POCH₂Ph), 5,10 (2H, s, COCH₂Ph), 7,34 (10H, m, H^{ar}).

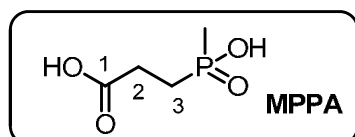
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 14,42 (d, J = 92 Hz, CH₃), 25,09 (d, J = 94 Hz, C³), 26,98 (d, J = 2,1 Hz, C²), 65,80 (d, J = 5,9 Hz, POCH₂Ph), 66,84 (s, COCH₂Ph), 127,9, 128,33, 128,43, 128,45, 128,63 et 128,7 (C^{Har}), 135,56 (C^{ar}), 136,44 (d, J = 5,5 Hz, C^{ar}), 171,94 (d, J = 15,2 Hz, C¹).

RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) δ 54,69.

IR (film, cm⁻¹) : 3034 (C-H ar v), 2950 (C-H alk v), 1735 (C=O ester v), 1456 (C-H δ), 1215 (P-O et P=O v), 1168 (C-O ester v), 1006 (C-H ar δ).

SM (ES+) m/z calculé pour C₁₈H₂₂O₄P: 333, 1266, exp: 333, 1256.

Acide 3-(hydroxy(méthyl)phosphoryl)propanoïque **MPPA** (C₄H₉O₄P, 152,09 g/mol)



A une solution de produit **114** (0,290 g, 0,91 mmol) dans le THF (14 mL), est additionné du Pd/C à 10 % (0,060 g). Le milieu réactionnel est agité pendant 1 heure à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Après filtration sur membrane (millipore, 0,22 μm) et évaporation du solvant, le solide blanc obtenu est repris dans H_2O puis déposé sur une colonne de résine acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est éluée à l'eau. Les fractions contenant le produit sont rassemblées, et concentrées sous pression réduite. Le résidu est ensuite lyophilisé. Le produit (MPPA) est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,100 g, **72 %**).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,5 (3H, $J = 14$ Hz, CH_3), 2,07 (2H, m, H^3), 2,65 (2H, m, H^2).

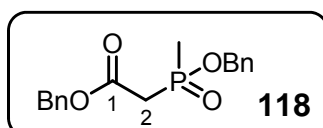
RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 13,65 (d, $J = 92$ Hz, CH_3), 24,74 (d, $J = 93,5$ Hz, C^3), 26,98 (d, $J = 1,9$ Hz, C^2), 176,54 (d, $J = 15$ Hz C^1).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4\text{P}$: 151, 0159, exp: 151, 0160.

RMN ^{31}P (162 MHz, D_2O) δ 45,68.

Analyses élémentaires calculé pour $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_4\text{P}$ 0,25 H_2O (%) C : 30,68, H : 6,11.
trouvé (%) C : 30,69, H : 6,17.

2-(benzyloxy(méthyl)phosphoryl) acétate de benzyle **118** ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{P}$ 318,30 g/mol)



Une solution de triéthylamine (2,4 mL, 17,1 mmol), et d'alcool benzylique anhydre (1,8 mL, 17,1 mmol) dans le THF anhydre (20 mL) est dégazée à l'argon et refroidie à 0 °C. On ajoute une solution de MePCl_2 (0,77 mL, 8,55 mmol) dans le THF anhydre (8 mL) dégazé à l'argon. Après agitation à température ambiante pendant une nuit, le milieu est filtré sous argon puis concentré à l'évaporateur rotatif (en cassant le vide avec de l'argon). Le $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Bn}$ (1,4 mL, 8,55 mmol) est additionné et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Le milieu est ensuite évaporé et le résidu est purifié par chromatographie éclairée (éluant: CH_2Cl_2 / MeOH 97/03). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,710 g, **26 %**).

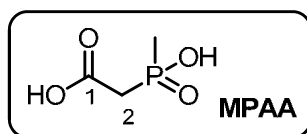
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,60 (3H, $J = 14,8$ Hz, CH_3), 3,03 (2H, d, $J = 17,3$ Hz, H^2), 5,08 (4H, m, POCH_2Ph et COCH_2Ph), 7,34 (10H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 15,04 (d, $J = 99$ Hz, CH_3), 38,18 (d, $J = 79,5$ Hz, C^2), 66,43 (d, $J = 6,1$ Hz, POCH_2Ph), 67,50 (s, COCH_2Ph), 128,35 (CH^{ar}), 135,14 (C^{ar}) 136,02 (C^{ar}), 166,18 (d, $J = 4$ Hz, C^1).

RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) δ 46,66.

IR (film, cm^{-1}) : 3034 (C-H ar ν), 2933 (C-H alk ν), 1730 (C=O ester ν), 1456 (C-H δ), 1267 (P=O ν), 1109 (C-O ester ν), 1001,09 (C-H ar δ).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{NaP}$: 341, 0924, exp: 341, 0919.

Acide 2-(hydroxy(méthyl)phosphoryl) acétique MPAA (C₃H₇O₄P, 138,06 g/mol)

Le MPAA a été obtenu après hydrogénolyse du composé **118** (0,273 g, 0,857 mmol) suivant le protocole décrit précédemment pour l'hydrogénolyse du composé **114**. Le produit est isolé sous la forme d'un poudre blanc (0,111 g, **94 %**).

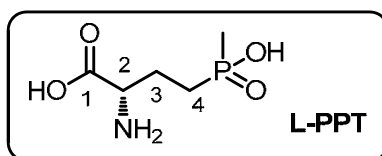
RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,57 (3H, d, J = 14,8 Hz, CH₃), 3,00 (2H, d, J = 17,2 Hz, H²).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 14,46 (d, J = 97 Hz, CH₃), 38,30 (d, J = 81 Hz, C²), 170,57 (d, J = 4,6 Hz, C¹).

RMN ³¹P (162 MHz, D₂O) δ 45,68.

SM (ES+) m/z calculé pour C₃H₆O₄P: 137, 0009, exp: 137, 0004.

Analyses élémentaires calculé pour C₃H₇O₄P (%) C : 26,10, H : 5,11.
trouvé (%) C : 25,86, H : 5,03.

Acide(2S)-2-amino-4-(hydroxy(méthyl)phosphoryl)butanoïque L-PPT (C₅H₁₂NO₄181,13 g/mol)Première méthode

Le PPTO (0,1 g, 0.55 mmol), du Glu (0,408 g, 2,75 mmol) et le PLP (250 µl d'une solution à 10 mM) sont dissous dans H₂O (20 mL). Le pH est ajusté à 7,6 avec une solution aqueuse de KOH 1M puis le volume est ajusté à 27,5 mL avec H₂O. La BCAT (4UI, 400µL) est centrifugé (5 min, 14500 t/min). Le culot est ensuite repris avec 1 mL de milieu réactionnel et la solution est additionnée au reste du milieu réactionnel. Après agitation à température ambiante pendant 24 heures, le milieu réactionnel est déposé sur une résine acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H⁺). La résine est lavée à l'eau afin d'éliminer le PPTO résiduel, l'excès d'ACS et l'acide pyruvique. Une seconde élution à l'ammoniaque 1M permet de décrocher la PPT et le Glu de la résine. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est ensuite repris dans un minimum d'eau et déposé sur une résine basique (Dowex 1X8-400) équilibré avec des ions acétates. La colonne est éluée à l'eau. Un gradient d'AcOH (0,1 à 0,25 M) permet ensuite de décrocher le Glu puis un gradient d'AcOH (0,5 à 1M) permet de décrocher la L-PPT. Les fractions contenant la PPT sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est repris dans 2 mL d'ammoniaque 1M concentré puis lyophilisé. La L-PPT est isolé sous la forme d'un solide vitreux (0,034 mg, **34 %**).

Deuxième méthode :

Le sel de potassium du PPTO (0,145 g, 0.5 mmol), du Glu (0,015 g, 0,05 mmol), l'ACS (0,077 g, 0,5 mmol) et le PLP (250 µl d'une solution à 10 mM) sont dissous dans H₂O (20 mL). Le pH est ajusté à 7,6 avec une solution aqueuse de KOH (1M) puis le volume est

ajusté à 25 mL avec H₂O. la BCAT (4UI, 400 µL) et l'AAT (20 UI, 80 µl) sont centrifugés (5 min, 14500 t/min). Le culot de chaque enzyme est ensuite dissous dans 1 ml de milieu réactionnel et les solutions sont additionnées au reste du milieu réactionnel. Après agitation à température ambiante pendant 24 heures, le milieu est traité de la même façon que dans la première méthode. La L-PPT est isolé sous la forme d'un solide vitreux (0,030 g, 33 %).

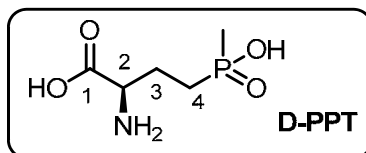
Troisième méthode

Le sel de potassium du PPTO (0,100 g, 0.39 mmol), du Glu (0,115 g, 0,11 mmol), du NADH (0,055 g, 0,078 mmol), le PLP (250 µl d'une solution à 10 mM) et du NH₄⁺HCO₂⁻ (0,064 g, 0,97 mmol) sont dissous dans H₂O (20 mL) d. Le pH est ajusté à 7,6 avec une solution aqueuse de KOH (1M) puis le volume est ajusté à 27,5 mL avec H₂O. La FDH (1 mg) est ajouté. Le BCAT (4UI, 400µL), le GluDH (5UI, 10 µL) sont centrifugés (5 min, 14500 t/min). Le culot de chaque enzyme est ensuite repris avec 1 mL de milieu réactionnel et les solutions sont additionnées au reste du milieu réactionnel. Après agitation à température ambiante pendant 24 heures, Le milieu est traité de la même façon que dans la première méthode. La L-PPT est isolé sous la forme d'un solide viteurx (0,070 g, 64%).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,22 (3H, d, J = 16 Hz, CH₃), 1,62 (2H, m, H⁴), 2,06(2H,m, H³), 3,768 (1H, m, H²).

Analyses élémentaires: calculé pour C₁₃H₁₇NO₆ 0,5H₂O(%) C : 31,58, H : 6,89, N: 7,37 :
trouvé (%) C : 31,4, H : 6,89, N: 7,37.

Acide (2R)-2-amino-3,3-(hydroxy (méthyl) phosphoryl) butanoïque D-PPT (C₅H₁₂NO₄P, 181,13 g/mol)



Première méthode

Le sel de potassium du PPTO (0,300 g 1,17 mmol), le D-Glu (0,172 g, 1,17 mmol), le NADH (0,042 g, 0,6 mmol), du NH₄⁺HCO₂⁻ (0,149 g, 2,4 mmol) et le PLP (2 mg) sont dissous dans H₂O (50 mL). Le pH est ajusté à 7,6 avec une solution aqueuse du KOH 1M puis le volume est ajusté à 60 mL avec H₂O. Le GluDH (10UI, 10µl) est centrifugé (5 min, 14500 t/min). Le culot est repris avec 1 mL de milieu réactionnel puis ajouté au milieu, la FDH (5 UI, 5 mg) et la D-AT (2 mg) sont ensuite ajouté au milieu réactionnel, qui est agité à température ambiante pendant 36 heures. Le milieu est ensuite traité comme décrit précédemment pour la synthèse de la L-PPT. La D-PPT est isolée la forme d'un solide viteurx (0,100 g, 49 % et ee > 99).

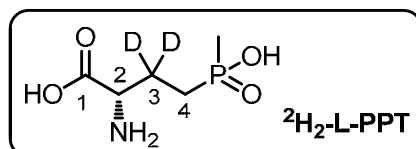
Deuxième méthode:

Le même protocole que celui décrit pour la première méthode est utilisé en remplaçant le D-Glu par la D-Ala et la LDH. La D-PPT est isolée la forme d'une dolide viteurx (0,083 g, 36 %, ee > 98%).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,22 (3H, d, $J = 16$ Hz, CH_3), 1,62 (2H, m, H^4), 2,06 (2H, m, H^3), 3,768 (2H, m, H^2).

La pureté énantiomérique est déterminée par HPLC (colonne CROWNPACK CR+ (Daicel); Eluant: HClO_4 , pH 1 ; Débit 0,5 mL/min ; 220 nm ; température : 5°C) T_R D-PPT : 4 min ; T_R L-PPT : 9 min ; ee > 99 %.

Acide (2S)-2-amino-3,3-didéutérium-4-(hydroxy(méthyl)phosphoryl)butanoïque $^2\text{H}_2$ -L-PPT ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{D}_2\text{NO}_4\text{P}$ 183,14 g/mol)



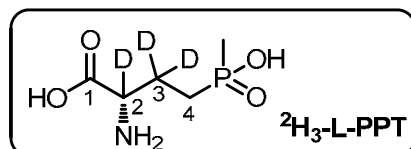
Une solution de PPTO (0,025 g, 0,138 mmol) dans D_2O est ajustée à pH = 11,7 par addition de LiOH et incubée à température ambiante pendant 1 heure. Cette solution est additionnée à un mélange de Glu (4 mg, 0,03 mmol), de NADH (20 mg, 0,03 mmol), de $\text{NH}_4^+\text{HCO}_2^-$ (11 mg, 0,17 mmol) dans H_2O (2 mL) ajusté à pH 7,6 avec une solution aqueuse de LiOH 0,1M. La FDH (1 mg) est ajoutée. La BCAT (3 UI, 300 μL) et la GluDH (10 UI, 25 μL) sont centrifugées (5 min, 14500 t/min). Les culots sont ensuite repris avec 1 mL de milieu réactionnel et les solutions sont ajoutées au milieu réactionnel. Le milieu est ensuite agité à température ambiante pendant 24 heures puis déposé sur une colonne de résine acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est lavée à l'eau. Une seconde élution à ammoniacale 1M permet de décrocher la PPT et le Glu de la résine. Les fractions contenant le produit souhaité sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est ensuite repris dans un minimum d'eau et déposé sur une colonne de résine basique (Dowex 1X8-400). La colonne est éluee à l'eau puis avec un gradient d'AcOH (0,1 à 1 M) qui permet de décrocher le produit. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est ensuite lyophilisé. La L-PPT marquée au deutérium est isolée sous la forme d'un solide blanc (13,6 mg, 54 %).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,39 (3H, d, $J = 13,6$ Hz, CH_3), 1,77 (2H, m, H^4), 3,98 (1H, s, H^2).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 14,26 (d, $J = 92,4$ Hz, CH_3), 25,90 (d, $J = 91$ Hz, C^4), 53,85 (d, $J = 15,3$ Hz, C^2), 172,58 (C^1).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_5\text{H}_9\text{D}_2\text{NO}_4\text{P}$: 182, 0531, exp: 182, 0564.

Acide (2S)-2-amino-2,3,3-tridéutérium-4-(hydroxy(méthyl)phosphoryl) butanoïque $^2\text{H}_3$ -L-PPT ($\text{C}_5\text{H}_9\text{D}_3\text{NO}_4\text{P}$, 184,15 g/mol)



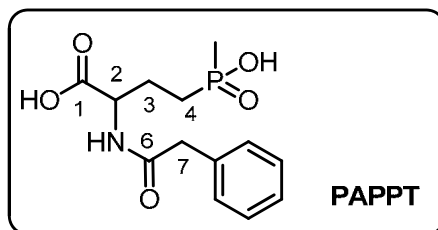
Le protocole décrit pour la synthèse de la $^2\text{H}_2$ -L-PPT a été reproduit en utilisant D_2O pour préparer les différentes solutions. La $^2\text{H}_3$ -L-PPT a été isolée sous la forme d'une solution d'un solide blanc (13,6 mg, 54 %).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,39 (3H, d, $J = 13,6$ Hz, CH_3), 1,77 (2H, m, H^4).

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O): 14,22 (d, $J = 92$ Hz, CH_3), 25,83 (d, $J = 91$ Hz, C^4), 172,52 (s, C^1).

SM (ES+) m/z calculé pour $\text{C}_5\text{H}_8\text{D}_3\text{NO}_4\text{P}$: 183, 0614, exp: 183, 0623.

Acide 4-(hydroxy(méthyl)phosphoryl)-2-(2-phénylacétamido)butanoïque PAPPT
($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_5\text{P}$, 299,26 g/mol)



A une solution de sel d'ammonium PPT (0,123 g, 0,623 mmol) dans H_2O (3 mL), est ajouté Et_3N (0,616 mL, 4,36 mmol) et le chlorure de 2-phénylacétyle (0,453 mL, 3,42 mmol). La réaction est agitée pendant une nuit à température ambiante. Le milieu est ensuite déposé sur une colonne de résine acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est lavée à l'eau. Les fractions contenant le produit sont concentrées. Le pH est ajusté à 3 avec une solution aqueuse de NaOH 1M. La phase aqueuse est lavée avec AcOEt (3 x 50 mL). La phase aqueuse est ensuite concentrée sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,199 g, quantitatif).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,45 (3H, d, $J = 13,8$ Hz, CH_3), 1,53 (2H, m, H^4), 1,84 (1H, m, H^{3a}), 1,97 (1H, m, H^{3b}), 3,60 (2H, m, H^7), 4,39 (1H, dd, $J = 4,2$ et 8 Hz, H^2), 7,28 (5H, m, H^{ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 14,44 (d, $J = 92$ Hz, CH_3), 24,9 (C^3), 27,47 (d, $J = 92$ Hz, C^4), 42,31 (C^7), 54,98 (d, $J = 16$ Hz, C^2), 127,39, 128,88 et 129,24 (CH^{ar}), 135,14 (C^{ar}), 174,44 (C^1), 177,07 (C^6).

Dédoublage cinétique de la PAPPT avec la pénicilline acylase (PA)

Une solution de PAPPT (0,16 g, 0,53 mmol) dans H_2O (10 mL) est ajustée à pH 7,8 avec une solution aqueuse de NaOH 1M puis le volume est ajusté à 20 mL avec H_2O . La PA (2U, 8 mg) est ensuite ajouté. Après agitation à température ambiante pendant 10 heures, le milieu réactionnel est déposé sur une colonne de résine acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est lavée à l'eau afin d'éluer le PAPPT résiduel, une seconde élution à l'ammoniaque 1M permet de décrocher la L-PPT obtenue après concentration sous la forme d'un solide vitreux (54 mg, **51 %**). Après concentration, la PAPPT est dissoute dans une solution aqueuse de HCl 6M. Après chauffage à reflux pendant 6 heures, la solution est concentrée sous pression réduite et le résidu déposé sur une colonne de résine acide (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est lavée à l'eau puis élue à l'ammoniaque 1M. Les fractions contenant la PPT sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est dissous dans H_2O (4 mL) est déposé sur une colonne de résine basique (Dowex 1X8-400). La colonne est élue à l'eau puis avec un gradient d' AcOH (0,1 à 1 M). Les fractions contenant le produit sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est ensuite lyophilisé. La D-PPT est isolée sous la forme d'un solide blanc (39 mg, **40 %**).

La pureté énantiomérique est déterminé par HPLC (colonne CROWNPACK CR+ (Daicel); Eluant: HClO_4 , pH 1 ; Débit 0,5 mL/min ; 220 nm ; température : 5°C) T_R D-PPT : 4 min ; T_R L-PPT : 9 min ; L-PPT : ee = 77 % ; D-PPT : ee = 86 %.

ENZYMOLOGIE

Généralités

Toutes les solutions sont préparées en utilisant un tampon phosphate de potassium 0,1M, pH = 7,6. Les enzymes disponibles sous la forme de suspension dans le sulfate d'ammonium 3M, sont centrifugées (5 min, 14500 tours/min) et les culots sont solubilisés dans le tampon phosphate. Toutes les mesures cinétiques sont réalisées à 340 nm et dans des cuves de spectrophotomètre à usage unique en polystyrène avec un trajet optique de 1cm. Le spectrophotomètre utilisé est un HITACHI modèle U2010. Les mesures d'activité ont été aussi effectuées à 25 °C dans un laboratoire climatisé.

Les enzymes utilisées

- Malate déshydrogénase (MDH) de cœur de bovin (E.C.1.1.1.3.7, 8568 UI/mL, suspension dans le sulfate d'ammonium 3M) disponible chez Sigma
- lactate déshydrogénase (LDH) du muscle de lapin (E.C.1.1.1.27, 944 UI/mL suspension dans le sulfate d'ammonium 3M) disponible chez Sigma
- glutamate déshydrogénase (GluDH) de foie de bovin (E.C.1.4.1.3, 11358 UI/mL, suspension dans le sulfate d'ammonium 3M) disponible chez Sigma.
- formate déshydrogénase FDH du *candida boidinii* (EC 1.2.1.2 1,15 UI/mg, solide) disponible chez Sigma.
- D-aminotransférase (D-AT) disponible en 2008 chez Codexis (AT103).
- pénicilline acylase (PA) (240 UI/mg, solide) disponible chez Waterstone.
- BCAT produite et purifiée au laboratoire (10 UI/mL, suspension dans le sulfate d'ammonium 3M).

Les UI indiquées correspondent aux vitesses maximales mesurées avec les substrats naturels dans les conditions standards. Pour les ATs, les conditions sont les suivantes :

- AspAT d'*E.coli* : tampon phosphate de K 0,1M, pH 7,6, Asp 40 mM, KG 4 mM
- BCAT d'*E.coli* : tampon phosphate de K 0,1M, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, pH 7,6, Glu 40 mM, MOPA (acide 4-méthyl-2-oxo-pentanoïque) 4mM.

Dans les protocoles de mesures d'activité, les quantités indiquées entre parenthèses correspondent aux valeurs finales dans la cuve de mesure.

Protocole pour la culture des souches d'*E.coli* TY103-AspC et la purification de l'AspAT d'*E.coli*

Culture des cellules :

La souche TY103-AspC est conservée à -80 °C dans un milieu LB (10 g/L Trypton, 5 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de NaCl) + glycérol (10 %). A partir d'un échantillon congelé de 3 mL, on effectue une pré-culture dans 100 mL de milieu LB en présence d'ampicilline (0,3 mM) pendant 24 h à 30 °C. L'inoculum obtenu est ensuite introduit dans 5 L de milieu LB contenant de l'ampicilline (0,3 mM) et de l'IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactosidase) pendant 24 h à 4 °C. A l'issue de la culture, les cellules sont récoltées sous forme d'un culot par centrifugation à 8000 tours/min pendant 30 min à 25 °C. On reprend 10 g de culot cellulaire dans 100 mL de tampon DEAE (KH₂PO₄ 10 mM, AcOK 10 mM, acide succinique 10 mM, mercaptoéthanol 5 mM, pH ajusté à 6 avec une solution aqueuse de KOH 1M) puis les cellules sont broyées par sonication (sonicateur *Sonopuls* de Bandelin: 50 % amplitude; 15 min; 30s ON, 30s OFF). Le broyat des cellules obtenu est dilué avec du tampon DEAE

jusqu'à obtenir un volume total de 200 mL. On ajoute 200 μ L d'une solution de phosphate de pyridoxal à 10 mM dont le pH a été ajusté à 7 par ajout d'une solution aqueuse de KOH. Deux centrifugations successives à 8000 tours / min pendant 30 min à 4 °C sont effectuées afin d'éliminer les débris cellulaires. On obtient alors un extrait brut de protéines qui peut être conservé quelques jours à 4 °C.

Purification :

Les étapes de chromatographie sont effectuées en utilisant un système de chromatographie basse pression de marque Pharmacia installé dans une chambre froide (4-10 °C).

Chromatographie DEAE :

L'extrait brut est tout d'abord purifié par chromatographie sur résine DEAE-Toyopearl (DiEthylAminoEthyl). 200 mL de gel commercial sont rincés avec 3 à 5 volumes d'eau chaude sur fritté, puis avec le tampon DEAE (1 à 2 volumes). Le gel est ensuite décanté. Le surnageant est éliminé car il présente de fines particules qui peuvent colmater la colonne.

Le gel est ensuite introduit dans une colonne (120 mL), puis équilibré au moyen du tampon DEAE avec un débit de 0,5 mL/min pendant 20 h. L'extrait brut est alors déposé sur la colonne par gravité puis on procède à l'élution de la colonne avec un débit de 0,5 mL/min. L'élution s'effectue avec un gradient de concentration en NaCl de 0 à 0,5 M (3 volumes de colonne). On procède ensuite aux dosages de l'activité enzymatique et des protéines pour chaque fraction de 5 mL recueillie.

Notons que la phase DEAE peut être régénérée par rinçage avec un tampon DEAE 1M en NaCl (3 volumes de colonne) puis un tampon DEAE (3 volumes de colonne).

Chromatographie HA :

Une seconde purification de l'enzyme par chromatographie sur HA (hydroxyapatite) est ensuite réalisée. La colonne est montée avec une phase HA (150 mL, BIO-RAD) préalablement décantée et équilibrée avec le tampon HA (KH_2PO_4 2 mM, acide succinique 10 mM, mercaptoéthanol 5 mM, pH 7,0) avec un débit de 0,5 mL/min pendant 20 h. L'extrait de protéine issu de la purification par chromatographie DEAE et préalablement dialysé avec du tampon HA dans une cellule d'ultrafiltration (AMICON), est déposé sur la colonne par gravité puis on procède à son élution avec le tampon HA, un débit de 0,5 mL/min et un gradient de concentration en KPi allant de 2 à 100 mM (3 volumes). On procède ensuite aux dosages de l'activité enzymatique et des protéines pour chaque fraction recueillie et à leur analyse par électrophorèse SDS PAGE.

Notons que la phase HA peut être régénérée par rinçage avec un tampon HA à 200 mM en KPi (3 volumes de colonne) puis un tampon HA à 2 mM en KH_2PO_4 (3 volumes de colonne).

Les fractions d'enzymes sont mélangées puis dialysées avec une solution de sulfate d'ammonium (3M, 2 x 1L en 20h) afin d'obtenir la précipitation de l'enzyme. L'AspAT est finalement stockée dans des ependorfs de 1 mL, en suspension dans une solution de sulfate d'ammonium, à + 4°C et peut être ainsi conservée quelques années sans perte d'activité.

Electrophorèse SDS PAGE :

Préparation du gel :

Le gel de séparation à 12,5 % en acrylamide est préparé en mélangeant 12,5 g d'acrylamide, 0,34 g de bis-acrylamide, 4,65 g de tris (tris(hydroxyméthyl)(aminométhane), 0,1 g de SDS, 10 g de Glycérol, QSP eau 100 mL. Le pH est ajusté à 8,8 par ajout d'HCl 1M.

Le gel de concentration à 5 % en acrylamide est préparé en mélangeant 5 g d'acrylamide, 0,14 g de bis acrylamide, 1,41 g de Tris et 0,05 SDS, QSP eau 50 mL, pH à 6,8 (HCl 1M).

Entre deux plaques, on fait couler doucement environ 10 mL d'un mélange de 10 mL de gel de séparation, 23 μ L de persulfate d'ammonium à 10 % et 5 μ L de TEMED. Un peu d'eau est ajouté pour avoir une surface bien plane du gel. Le gel polymérise au bout de 30 min à Ta. L'eau est alors retirée à l'aide d'un papier filtre et on refait couler entre les deux plaques le mélange suivant avant sa polymérisation : 20 μ L de persulfate d'ammonium à 10 %, 2 μ L de TEMED et 5 mL du gel de concentration. Le mélange est recouvert d'un peigne pour faire les puits prévus pour déposer les échantillons de protéine. La polymérisation se fait à Ta au bout de quelques heures. Le peigne est enlevé libérant ainsi les puits.

Préparation des échantillons de protéines :

20 μ L d'échantillon protéique (contenant environ 20 μ g de protéines) à étudier est dissous dans 20 μ L de tampon Tris 0,1M pH 6,8 et 20 μ L d'une solution Laemmli (1,6 mL SDS 10 %, 0,4 mL mercaptoéthanol, 1 mL de Tris, 0,1 M, pH = 6,8, 0,8 mL de glycérol et quelques gouttes de bleu de bromophénol, QSP 8 mL avec H₂O). Le mélange est chauffé 5 minutes à 80 °C puis est déposé dans les puits prévus à cet effet.

La migration s'effectue alors en appliquant un champ électrique de 20 mV pour la concentration et 30 mV pour la séparation dans un tampon d'électrophorèse contenant 3,05 g de Tris, 14,25 g de glycine, 1g de SDS, pH = 6,8, QSP eau 1L.

Après migration, le gel est coloré pendant 30 min avec une solution contenant 55 mg de bleu de Coomassie, 95 mL de MeOH, 1 mL d'acide acétique et 95 mL d'eau. Il est ensuite décoloré par une solution contenant 90 mL de MeOH, 200 mL d'EtOH, 200 mL d'acide acétique, 50 mL de glycérol et 146 mL d'eau.

Dosage des protéines par la méthode Bradford :

Un échantillon de 100 μ L est dosé par addition de 5 mL de solution de Bradford (100 mg de bleu de coomassie brillant G dans 50 mL d'EtOH, 100 mL d'acide phosphorique à 85 %, QSP eau 1L). Après agitation et incubation à Ta pendant 5 min, la DO est mesurée à 595 nm. Une gamme étalon allant de 0,2 à 1 mg/mL est réalisée avec une solution titrée d'albumine de sérum bovin (BSA). La concentration en protéines de l'échantillon (mg/mL) est déterminée en reportant les valeurs de DO sur la courbe étalon.

Dosage de l'activité spécifique de l'AspAT:

Dans une cuve sont introduits : 20 μ L d'une solution de NADH à environ 10 mg/mL (0,2 mM); 10 μ L d'une solution de MDH à 200 UI/mL (2UI); 5 μ L d'une solution d'AspAT (diluée de façon à avoir une durée de transamination comprise entre 100 et 600 s, 0,2 UI), QSP 1 mL de tampon phosphate 0,1 M, Asp 40 mM, pH = 7,6. Une fois la DO stabilisée, on ajoute 20 μ L d'une solution de KG à 0,2 M et on mesure l'évolution de la DO à 340 nm en fonction du temps. La vitesse et donc l'activité de l'enzyme sont déterminées à partir de la pente de la droite représentant la DO en fonction du temps en utilisant $\epsilon_{\text{NADH},340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Il suffit de diviser cette activité en UI/mL par la concentration en protéines (mg de protéines/mL) pour obtenir l'activité spécifique de l'AspAT en UI/mg de protéines.

Protocole du dosage d'activité pour la détermination des paramètres cinétiques d'un substrat de l'AspAT

Dans une cuve sont introduits : 20 μL d'une solution de NADH à 10 mg/mL (0,2 mM); 10 μL d'une solution de MDH à 200 UI/mL (2 UI); 10 μL d'une solution d'AspAT (diluée de façon à avoir une durée de réaction comprise entre 100 et 600 s), 5-20 μL d'une solution de KG 0,02 M ou 0,2 M (0,1-4 mM); QSP 1 mL avec du tampon phosphate 0,1 M contenant Asp 40 mM et à pH = 7,6.

La variation de DO à 340 nm est alors mesurée en fonction du temps. La vitesse de la réaction (v_i) est alors calculée en utilisant $\epsilon_{\text{NADH},340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Les paramètres cinétiques sont ensuite déterminés en utilisant le traitement graphique de Hanes-Woolf ($(S)/V = f(S)$; $(S)/V = S/V_m + V_m/K_m$). Chaque droite comporte un minimum de 5 points (concentration en substrat), chacun correspondant à la moyenne d'au moins 2 valeurs expérimentales. Les données brutes sont traitées avec le logiciel Excel qui permet par régression linéaire de calculer les valeurs de la pente et de l'ordonnée à l'origine ainsi que d'estimer les erreurs standards. Les incertitudes sur les valeurs de K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m sont par ailleurs calculées en utilisant les lois de propagation d'erreurs de Gauss.

Dosage de l'activité spécifique de la D-AT avec la D-Ala :

Dans une cuve sont introduits : 20 μL d'une solution de NADH à 10 mg/mL (0,2 mM) ; 10 μL d'une solution de LDH à 200 UI/mL (2UI) ; 10 μL d'une solution de D-AT à 0,1 mg/mL ; 5-20 μL d'une solution de KG 0,02 M ou 0,2 M (0,1-1 mM) ; QSP 1 mL avec du tampon phosphate 0,1 M contenant D-Ala 40 mM et à pH = 7,6.

La même démarche que dans le cas précédent a été adoptée pour déterminer les valeurs de K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m ainsi que les incertitudes.